

Université de Montréal

Rôle de la CTNNB1 et de ses nouveaux partenaires dans la régulation de l'immunité antivirale
innée et de la voie WNT

Par Salwa Es-Saad

Programme de biologie moléculaire, Option biologie des systèmes
Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de Philosophiae Doctor en biologie moléculaire
Option biologie des systèmes

Novembre, 2018

© Salwa Es-Saad,

Résumé

L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme contre l'infection virale. La réponse antivirale est initiée par la reconnaissance du pathogène par des récepteurs spécifiques, qui reconnaissent les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes, puis initient des voies de signalisation conduisant à l'activation des facteurs de transcription essentiels tels que IRF3 et NF- κ B, ce qui entraîne la production des interférons de type I (IFN α et β). Notre laboratoire a réalisé le premier criblage aux ARN interférant à l'échelle génomique, qui a permis l'identification de centaines de nouveaux régulateurs de l'IFN β en réponse à l'infection par le virus à ARN Sendai (VS). Le criblage ARNi a identifié WNT2B et WNT9B en tant que régulateurs négatifs de la réponse antivirale médiée par les RLRs. Nous avons démontré que WNT2B et WNT9B sont sécrétés suite à l'infection virale et qu'ils régulent négativement l'expression des gènes anti-viraux IFNB1, IFIT1 et TNF. Cette découverte nous a incités à explorer la contribution de la voie de signalisation WNT/CTNNB1 dans la régulation négative de la réponse innée aux virus à ARN. Nous avons démontré que l'infection virale induit l'accumulation d'une forme stabilisée de la CTNNB1 et que le silençage de la CTNNB1 augmente l'expression induite par le VS d'IFNB1, IFIT1 et TNF. Inversement, la stabilisation de la CTNNB1 par des inhibiteurs de GSK3 a entraîné une réduction drastique de la transcription d'IFNB1 et d'IFIT1, mais cette diminution est restaurée dans les cellules déplétées de la CTNNB1. Nous avons également démontré que la CTNNB1 interagit de manière constitutive avec NF- κ B (p65) alors que son interaction avec IRF3 est augmentée suite à l'infection par le VS.

Pour mieux élucider le mécanisme d'action de la CTNNB1 dans la régulation de l'immunité antivirale, nous avons utilisé la spectrométrie de masse quantitative pour identifier l'interactome de la CTNNB1 en réponse à l'infection par le VS ou à l'inhibition de GSK3. Nous avons identifié DDB1(DNA Damage-Binding protein 1) comme un partenaire de la CTNNB1 dont l'interaction est réduite en réponse à l'infection par le VS ou à l'activation de la voie WNT/CTNNB1. Nous avons démontré que DDB1 régule négativement l'activité transcriptionnelle de la CTNNB1 en favorisant son ubiquitination et en réduisant sa demi-vie après une stimulation par WNT3A. De plus, nous avons caractérisé DDB1 comme un

régulateur négatif de la transcription d'IFNB1. Sur le plan mécanistique, nos résultats préliminaires indiquent que l'ubiquitination de la CTNNB1, qui normalement conduit à sa dégradation par le protéasome, est inhibée suite à l'infection par le VS tandis que le silençage de DDB1 restaure cet effet. Ces résultats suggèrent que DDB1 contribue à une stabilisation de la CTNNB1 dans le contexte de l'infection virale, offrant ainsi un nouveau mécanisme post-transcriptionnel de la régulation négative de l'immunité antivirale innée par la CTNNB1. Nous avons également identifié le répresseur transcriptionnel NKRF (NF- κ B repressing factor) en tant qu'interactant de la CTNNB1 qui régule négativement la transcription d'IFNB1 suite à l'infection virale. De plus, le silençage de NKRF et de la CTNNB1 individuellement ou en combinaison augmente la transcription endogène d'IFNB1, d'IFIT1 et de TNF à un niveau similaire suggérant que ces deux protéines fonctionnent par un même mécanisme. Ces données soutiennent fortement le recrutement de complexes protéiques contenant la CTNNB1 et NKRF afin de désactiver la transcription d'IFNB1, TNF et IFIT1 par des mécanismes de répression épigénétiques et/ou transcriptionnels, et de contrôler l'expression excessive des gènes de l'immunité innée suite à l'infection virale.

En conclusion, nos résultats ont identifié une nouvelle régulation de l'immunité innée antivirale par la CTNNB1 et ses régulateurs, ouvrant la voie à de nouvelles avenues pour des cibles antivirales à large spectre et à la prévention des maladies liées à l'immunité lors d'une infection virale.

Mots-clés : Criblage aux ARNi, immunité antivirale innée, signalisation WNT/CTNNB1, spectrométrie de masse, DDB1, NKRF

Abstract

The host innate response to viral infection relies on the presence of pattern recognition receptors (PRR) that specifically recognize pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and then initiate signaling pathways and activate key transcription factors such as IRF3 and NF- κ B, which lead to the synthesis of type I interferon (IFN- α/β). In a research program aimed at the discovery of regulators of innate immunity, we performed the first genome-wide silencing screen in response to Sendai virus (SeV) infection. The RNAi screen identified WNT2B and WNT9B as negative regulators of RLR-mediated antiviral response. We next showed that WNT2B and WNT9B are secreted upon viral infection and negatively regulate expression of representative inducible genes *IFNB1*, *IFIT1* and *TNF*. We further investigated a canonical-like WNT pathway that culminates in CTNNB1 accumulation. Coherently, we found that viral infection induces the accumulation of a stabilized form of CTNNB1 and that CTNNB1 gene silencing increases SeV-induced *IFNB1*, *IFIT1* and *TNF* expression. Conversely, CTNNB1 stabilization using GSK3 inhibitors resulted in a drastic reduction of virus-induced *IFNB1* transcription and *IFIT1* expression, but this decrease is restored in CTNNB1 knockdown cells. To uncover mechanistically how CTNNB1 regulated the antiviral immunity, we used quantitative mass-spectrometry to identify CTNNB1 interactome upon SeV infection or GSK3 inhibition. We identified DNA damage-binding protein 1 (DDB1) as an interactor of CTNNB1 that is reduced of CTNNB1 upon SeV or WNT3A stimulations. We showed that DDB1 negatively regulates CTNNB1 transcriptional activity by promoting its ubiquitination and reducing protein half-life following WNT3A stimulation. Strikingly, CTNNB1 ubiquitination is inhibited in SeV-infected cells and restored upon DDB1 depletion, consistent with a distinct role of DDB1 in preventing CTNNB1 degradation and inhibiting the antiviral innate response. We also identified the transcriptional repressor NKRF (NF- κ B repressing factor) as a CTNNB1 interactor upon viral infection that negatively regulates *IFNB1* production of SeV-infected cells without modulating the canonical pathway with WNT3A. We showed that NKRF KD, CTNNB1 KD and combination increase *IFNB1*, *IFIT1* and *TNF* transcription to similar fold induction of mRNA levels. The data highly support the recruitment of CTNNB1-NKRF containing protein complexes to turn off *IFNB1*, *TNF* and

IFIT1 transcription by epigenetic and/or transcriptional repression mechanisms, and control innate immune gene expression after virus recognition signals have resolved. Overall, our findings identify a novel regulation of antiviral innate immunity by CTNNB1 and its regulators, paving the way for novel avenues for broad-spectrum antiviral targets and preventing immune-mediated diseases upon viral infection.

Keywords: ARNi screen, innate antiviral immunity, WNT/CTNNB1 signaling, mass spectrometry, DDB1, NKRF.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations et sigles.....	xvi
Remerciements.....	xxii
Avant propos.....	xxiii
Chapitre I	1
I.1 Introduction (Partie A) : l’immunité antivirale innée.....	2
I.1.1 Présentation	2
I.1.2 Reconnaissance du pathogène viral par les TLRs	4
I.1.2.1 TLR3 : ligands et signalisation.....	6
I.1.2.2 TLR7, TLR8 et TLR9: ligands et signalisation.....	7
I.1.2.3 Régulation des TLRs	8
I.1.2.4 Les TLRs : cible importante dans les thérapies anti-virales.....	11
I.1.3 Reconnaissance du pathogène viral par les RLRs.....	12
I.1.3.1 Structure et ligands	12
I.1.3.2 Les plateformes de signalisation de MAVS se produisent dans des organites distints.....	15
I.1.3.3 Régulation de la signalisation des RLRs	19
I.1.3.3.1 Régulation au niveau de la reconnaissance	20
I.1.3.3.2 Régulation au niveau de la transduction du signal	21
I.1.3.3.3 Régulation au niveau des facteurs de transcription IRF3 et NF-κB.....	22
I.1.4 Reconnaissance du pathogène viral par des récepteurs cytosoliques autres que les RLRs	23

I.2.3.2	Le complexe de destruction contrôle la stabilité de la CTNNB1	60
I.2.3.3	Le recrutement TCF-LEF indépendant de la CTNNB1 sur la chromatine :	63
I.2.3.4	Régulation des fonctions de la CTNNB1 par les modifications post-traductionnelles	68
I.2.3.4.1	Régulation de la CTNNB1 par la phosphorylation	72
I.2.3.4.1.1	La phosphorylation régule la stabilité de la CTNNB1	72
I.2.3.4.1.2	La phosphorylation régule les fonctions d'adhésion et de signalisation de la CTNNB1	73
I.2.3.4.2	Régulation de la CTNNB1 par l'ubiquitination	76
I.2.3.4.3	Régulation de la CTNNB1 par l'acétylation	79
I.2.4	La voie de signalisation WNT/CTNNB1 dans la régulation de l'immunité	80
I.2.4.1	Régulation négative de la réponse immunitaire innée par la voie WNT/CTNNB1 lors d'infections bactériennes.....	81
I.2.4.2	Régulation de l'immunité innée par la voie WNT/CTNNB1 suite à une infection virale	83
I.2.4.3	Les virus qui interfèrent avec la voie WNT/CTNNB1	90
I.2.4.3.1	Les effets des protéines virales oncogéniques sur la signalisation WNT/CTNNB1	91
I.2.4.3.1.1	le VHC.....	91
I.2.4.3.1.2	Le VHB.....	93
I.2.4.3.1.3	Autres Virus.....	93
I.2.4.3.1.4	Outre l'effet oncogénique, l'intérêt d'activer la signalisation WNT/CTNNB1 suite à une infection virale :	97
I.3	Problématique de recherche et objectifs du projet de thèse:	99
Chapitre II	101
II.	Genome-wide RNAi Screen Reveals a New Role of a WNT/CTNNB1 Signaling Pathway as Negative Regulator of Virus-induced Innate Immune Responses.....	102
II.1	Abstract	103
II.1.1	Author Summary	103
II.2	Introduction	104

II.3 Results	105
II.3.1 Genome-wide RNAi screen identify modulators of SeV-induced <i>IFNB1</i> expression	105
II.3.2 Bioinformatics analysis of gene hits	110
II.3.3 Secretion of WNT2B and WNT9B acts in a feedback inhibition of SeV-induced <i>IFNB1</i> transcription	112
II.3.4 CTNNB1 negatively regulates <i>IFNB1</i> gene expression.....	116
II.3.5 GSK3 inhibitors block innate response through CTNNB1 stabilization	121
II.3.6 WNT/CTNNB1 pathway negatively regulates innate immune response in primary human cells	124
II.3.7 Virus-induced CTNNB1 association with IRF3	127
II.4 Discussion	128
II.5 Materials and methods	136
II.6 Supporting information	145
II.6.1 Supplemental figures.....	145
II.6.2 Supplemental tables.....	154
II.7 Acknowledgements	154
Chapitre III.....	156
III. L'étude de l'interactome de la CTNNB1 suite à l'infection par le VS a identifié de nouveaux régulateurs de l'immunité antivirale.....	157
III.1 Introduction et mise en contexte	157
III.2 Méthodologie	159
III.3 Résultats	159
III.3.1 Identification de l'interactome de la CTNNB1 de cellules infectées au VS.....	159
III.3.2 Analyse fonctionnelle des nouveaux partenaires de la CTNNB1	162
III.3.3 Validation de l'interaction et de l'effet fonctionnel du candidat sélectionné NKRF	170
III.3.3.1 Validation de l'interaction NKRF et CTNNB1	171
III.3.3.2 Validation de l'effet fonctionnel de NKRF	172
III.4 Discussion	175

III.4.1 La CTNNB1 interagit avec des partenaires appartenant à trois groupes fonctionnels dans sa régulation de l'immunité antivirale :	176
III.4.2 Le potentiel rôle du complexe CTNNB1-NKRF dans la régulation négative de la réponse antivirale	179
Chapitre IV	185
IV. DDB1 differently regulates CTNNB1 protein levels upon WNT3A activation and Sendai virus infection.	186
IV.1 Abstract.....	186
IV.2 Introduction.....	187
IV.3 Materials and Methods	190
IV.4 Results.....	197
IV.4.1 Identification of CTNNB1 interaction partners modulated by GSK3 inhibition	197
IV.4.2 Functional analysis of newly identified CTNNB1 interaction partners	202
IV.4.3 DDB1 negatively regulates the WNT signaling pathway.....	206
IV.4.4 DDB1 promotes the stabilization of CTNNB1 in SeV-infected cells and inhibition of IFNB1 production.....	213
IV.5 Discussion.....	217
IV.6 Supporting information.....	224
IV.6.1 Supplemental figures.	224
Chapitre V	234
V. Discussion	235
V.1 La voie WNT/CTNNB1 régule négativement l'immunité antivirale	Erreur ! Signet non défini.
V.1.1 La sécrétion des ligands WNTs est un nouveau outil de l'immunité antivirale innée	Erreur ! Signet non défini.
V.1.2 La CTNNB1 est un régulateur négatif de l'immunité anti-virale innée	239
V.1.2.1 Rôle des inhibiteurs de GSK3 dans la régulation négative médiée par la CTNNB1	240
V.1.2.2 Les mécanismes potentiels de la régulation négative de l'immunité antivirale par la CTNNB1	Erreur ! Signet non défini.

V.1.2.2.1 La CTNNB1 régule négativement l'immunité innée en interférant principalement avec NF- κ B	242
V.1.2.2.1.1 Les mécanismes potentiels pour l'inhibition de l'activité de p65 par la CTNNB1 dans la régulation négative de la réponse d'IFNB1	Erreur ! Signet non défini.
V.1.2.2.1.2 Contribution de la voie WNT/CTNNB1 dans le dérèglement des mécanismes de régulation de la réponse innée	Erreur ! Signet non défini.
V.1.2.2.2 Le rôle d' IRF3 dans la régulation négative de l'immunité antivirale par la CTNNB1	Erreur ! Signet non défini.
V.1.2.3 Les mécanismes inexplorés dans la régulation de l'immunité innée par la CTNNB1	Erreur ! Signet non défini.
V.1.2.3.1 Les MPTs associées à la régulation négative.....	246
V.1.2.3.2 Une approche à large spectre	249
V.2 La spectrométrie de masse	250
V.2.1.1 Les mécanismes potentiels de la protection de la CTNNB1 contre la dégradation suite à l'infection par le VS.....	Erreur ! Signet non défini.
V.2.1.2 Les mécanismes moléculaires possibles de la régulation différentielle de la stabilité de la CTNNB1 par le système CUL4-DDB1	254
V.2.1.3 DDB1 dans les interactions virus-hôte et approche thérapeutique antivirale	Erreur ! Signet non défini.
V.2.1.4 DDB1 et la stabilisation de la CTNNB1 dans les cellules tumorales et dans la cellules infectées	254
V.2.2 NKRF et la formation d'un complexe répressionnel avec la CTNNB1 sur le promoteur d'IFNB1	258
V.2.2.1 Les mécanismes potentiels de la régulation négative d'IFNB1 par le complexe CTNNB1-NKRF.....	260
V.2.2.1.1 Induction de modifications épigénétiques sur le promoteur d'IFNB1....	260
V.2.2.1.2 Arrêt prématuré de l'élongation de la transcription d'IFNB1.....	262
V.2.2.2 L'importance du NRE dans la régulation négative des gènes antiviraux par le complexe NKRF -CTNNB1	Erreur ! Signet non défini.

V.2.2.3 le potentiel thérapeutique de cibler un complexe represser NKRF-CTNNB1 comme immunmodulateur	263
V.3 Conclusion	265
Bibliographie.....	269
Annexe 1: tableaux supplémentaires des résultats de la spectrométrie de masse (VS).....	i
Annexe 2: Supplemental tables for LC-MS/MS (BIO).....	ii

Liste des tableaux

Tableau I.1: Régulateurs négatifs de l'enhancéosome.	33
Tableau I.2: Les facteurs de transcription autres que LEF/TCF avec lesquels la CTNNB1 peut s'associer.....	68
Tableau I.3: Les modifications post-traductionnelles de la CTNNB1	72
Tableau I.4 : La régulation de l'immunité innée anti-virale par la CTNNB1	86
Tableau I.5: les effets des protéines virales sur la signalisation WNT/CTNNB1	97
Table II. S1. Summary of gene silencing screening data.....	154
Table II.S2. Venn diagram overlaps	154
Table II.S3. Oligonucleotide sequences and UPL probe used for HTS qRT-PCR.	154
Table II.S4. Oligonucleotide sequences and UPL probe used for qRT-PCR.....	154

Liste des figures

Figure I.1: Représentation schématique de la signalisation de l'immunité antivirale innée.	4
Figure I.2 : La structure des TLRs. Les TLRs sont des glycoprotéines membranaires.....	5
Figure I.3: Signalisation de TLR3.	7
Figure I.4 : Représentation schématique des domaines structuraux des RLRs.	13
Figure I.5 : Signalisation des RLRs.....	17
Figure I.6: Le MAM fonctionne comme une plateforme pour le système immunitaire antiviral inné.....	19
Figure I.7 : Reconnaissance de l'ADN par cGAS-STING.	27
Figure I.8 : Schématisation de la structure de l'enhanceosome assemblé. Suite à l'induction virale.....	30
Figure I.9: Formation des complexes ligands/récepteurs et signalisation des interférons de type I, II et III.]	38
Figure I.10 : Les différents rôles des ISGs dans la réponse antivirale.....	44
Figure I.11: la Sécrétion des WNTs.]	56
Figure I.12 : Structure de la CTNNB1.....	59
Figure I.13: Schéma simplifié de la signalisation WNT/CTNNB1..	62
Figure II.1: Genome-wide gene silencing study of virus-induced innate immune responses and bioinformatics analyses.....	109
Figure II.2: WNT2B and WNT9B ligands as novel negative regulators of antiviral innate immunity.....	115
Figure II.3: CTNNB1 is a negative regulator of antiviral innate immunity.....	118
Figure II. 4: SeV infection induces CTNNB1 stabilization and nuclear translocation. .	120
Figure II.5: Pharmacological inhibition of GSK3 stabilizes an active CTNNB1 pool and negatively regulates antiviral innate immunity.....	123
Figure II.6: WNT/CTNNB1 signaling acts as a negative regulator of the innate immune response in primary human cells.	126
Figure II.7: CTNNB1 associates with IRF3 and NF-κB subunit p65..	128

Figure II. 8: Cellular map of prioritized gene hits as potential modulators of innate immunity..	130
Figure III.1: Interactome de la CTNNB1 suite à l'infection par le VS.	160
Figure III.2: Les partenaires dont l'interaction avec la CTNNB1 est modulable par l'infection virale..	161
Figure III.3 : Réseau d'interaction protéine-protéine identifié à partir de STRING.....	162
Figure III.4 : Résultats du criblage fonctionnel sur l'IFNB1-Fluc.....	164
Figure III.5 : Groupe d'interactants de la CTNNB1 régulant spécifiquement l'expression d'IFNB1..	167
Figure III.6: Groupe d'interactants de la CTNNB1 régulant de la même façon l'expression d'IFNB1 et du TCF-LEF.	168
Figure III.7 : Groupe d'interactants de la CTNNB1 régulant d'une façon différentielle l'expression d'IFNB1 et du TCF-LEF.	170
Figure III.9: NKRF est un régulateur négatif de l'immunité antivirale.....	173
Figure III.10 : Régulation négative de l'immunité anti-virale par l'inhibition pharmacologique de GSK3 est restaurée par le silençage de NKRF.	174
Figure III.11: NKRF régule négativement l'expression endogène de gènes anti-viraux..	175
Figure IV.1: Identification of CTNNB1-protein interactions modulated by GSK3B inhibition.	198
Figure IV.2: CTNNB1 interactome at steady state and following GSK3 inhibition.	201
Figure IV.3. Functional epistasis shRNA analysis of the CTNNB1 modulated interactome using CTNNB1-dependent TCF/LEF-promoter driven reporter activity.....	206
Figure IV.4: Interaction between DDB1 and CTNNB1.	208
Figure IV.5: DDB1 reduced the abundance of CTNNB1.....	211
Figure IV.6: DDB1 ubiquitinates CTNNB1.....	213
Figure IV.7: DDB1 stabilized CTNNB1 following SeV infection..	217
Figure IV.8: Model of DDB1 mediated degradation of CTNNB1.	223
Figure IV.S1: CTNNB1 interactome.....	225
Figure IV.S2: Depleted or enriched CTNNB1 partners upon GSK3 inhibition.	226
Figure IV.S3: Schematic representation of the shRNA screen.	227

Figure IV.S4: Schematic representation of the regulatory role of newly identified modulated interactors of the CTNNB1 in the WNT canonical pathway.....	229
Figure IV.S6: Depletion of DDB1 increases CTNNB1 protein levels in Hela cells.	230
Figure IV.S7: CUL4A interacts and ubiquitinates CTNNB1.	232
Figure IV.S8: DDB1 is a negative regulator of IFNB1 transcriptional activity.....	233
Figure V.1 : Modèle des mécanismes potentiels de la régulation de l'immunité anti-virale par la CTNNB1.....	247
Figure V.2 : DDB1 stabilise la CTNNB1 dans les cellules du CCRs.....	255
Figure V.3 : la CTNNB1 régule négativement la réponse antivirale dans les CCRs....	257
Figure V.4 : NKRF et la CTNNB1 interagiraient au niveau nucléaire.....	259
Figure V.5 : HDAC2 régule négativement la transcription d'IFNB1.....	261
Figure V.6 : Régulation de l'immunité antivirale innée par la CTNNB1 et ses partenaires	267

Liste des abréviations et sigles

PRRs : (Pattern-Recognition Receptors)

ARNi : ARN interférant

shARN :short hairpin ARN

IFN : interferon

VS : virus Sendai

TLR : Toll-like receptor

PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns

DAMP :Danger Associated Molecular Patterns

CLR : C-type lectin receptor

NLR : NOD-Like Receptors

RLR : RIG-I-like receptor

ALR : AIM-2 like receptor

ISG : Interferon stimulated gene

DEC : Domaine extracellulaire

LRR : leucine-rich repeats

TIR : Toll interleukin (IL)-1 receptor

ARNdb : ARN double brin

ARNsb : ARN simple brin

miARN : microARN

ARNv : ARN viral

ARNm : ARN messenger

RE : réticulum endoplasmique

CMV: cytomégalovirus

EMCV: virus de l'encéphalomyocardite

EV71 : l'Entérovirus 71

EBV:Epstein–Barr virus

LRRC59 : Leucine-Rich Repeat Containing protein

HRS: Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate

TREML4 :Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells

Mint3 :Munc18-1-interacting protein 3

TRIM : Tripartite motif
 SENP2 :SUMO-specific protease 6
 VPH : virus du papillome humain
 VIH :virus de l'immunodéficience humain
 VHB :virus de l'hépatite B
 VHC : virus de l'hépatite C
 VIA : virus de l'influenza A
 RIG-I : retinoic acid inducible gene I
 MDA5 :melanoma differentiation associated gene 5
 LGP2 : laboratory of genetics and physiology 2
 CARD :caspase recrutement domain
 IFIT: IFN-Induced protein with Tetratricopeptide repeats
 RD : repressing domain
 CTD : C-terminal domain
 NTD :domine N-terminal
 VS : virus Sendai
 VMN : virus de la maladie de Newcastle
 JEV : virus de l'encéphalite japonaise
 DENV : virus de ka dengue
 VNO : virus du Nil occidental
 MAM : la membrane associée aux mitochondries
 MAVS : Mitochondrial AntiViral Signaling
 IRF3 : interferon regulatory factor 3
 NF-κB: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
 MPT : modification post-traductionnelle
 USP : (ubiquitin-specific protease
 ARL5B: ADP-Ribosylation Factor-Like protein 5B
 PP2A :protein phosphatase 2
 c-Cbl :Casitas B-lineage lymphoma
 RIP1/3 :receptor-interacting proteins 1 et 3
 ADNv : ADN viral

PRD : positive regulatory domains
 HMGA: High Mobility Group Protein A1
 GCN5: general-control-of-amino-acid synthesis 5
 CBP: CREB-binding protein
 NRE :Negative Regulatory Element
 NKRF :NF-κB repressing factor
 lcnRNA : les longs ARNs non-codant
 MCA : de membrane chorio-allantoïdienne
 NK : natural killers
 STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
 ISRE :IFN-Stimulated Response Element
 GAS : Gamma-Activated Sequence
 MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases
 ERK :Extracellular signal Regulated Kinases
 mTOR :Mammalian Target of Rapamycin
 RS V: respiratory syncytial virus
 RBP : RNA binding protein
 DDX : dead boxe
 VEB: virus Epsrein-barr
 MMTV:Mouse Mammary Tumor Virus
 WNT:Wg-Int1
 FZD: récepteur frizzled
 DRC: extracellulaire riche en cystéine N-terminal
 DVL :d ishevelled
 CID :Catenin Interaction Domain
 TCF/LEF: TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor)
 HDAC1: Histone DeACetylase1
 TBP :TATA-Binding Protein
 LRH1:Liver Receptor Homologue
 TEM : transition épithélio mésenchymateuse
 CD : complexe de destruction

GSK3 : glycogen synthase kinase 3
 APC: adenomatous polyposis coli
 CHC : cancers hépato-cellulaires
 PKA :protein Kinase A
 BCL9 : B-Cell Lymphoma9
 TBP : TATA Binding Protein
 SIAH-1: Seven in absentia homolog-1
 C-CBL :Casitas B-lineage Lymphoma
 MULE :Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3
 CCR : cancers colorectaux
 IκBα: l'inhibiteur cytoplasmique de NF-κB
 S.dysenteria : Shigella dysenteriae
 Mtb : Mycobactérieum tuberculosis
 L.monocytogenes :Listeria monocytogenes
 CREB : cAMP response element—binding protein)
 VRE :Virus-Responsive Element
 RVFV: Rift Valley Fever Virus
 OMS :Organisation Mondiale de la Santé
 SFRP2:Secreted FZD-Related Protein 2
 DKK1 :dickkopf 1
 CDH : Cadherin
 DAAs :Direct-Acting Antivirals
 PR, NR :positive regulator, negative regulator
 NT: Non target
 SSMD: strictly standardized mean difference
 GO: Gene ontology
 KD: Knockdown
 NHBE :normal human bronchial epithelial cells
 MDM :monocyte-derived macrophages
 YB1: Y-box-binding protein-1
 ZNF326: ZiNc Finger protein 326

IEG : Interferon Effector Genes

ChIP : chromatin immunoprecipitation

EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay

DDB1: DNA damage-binding protein 1

CHX: cycloheximide

Je dédie ma thèse à mes parents pour leur amour et dévouement

Remerciements

Je remercie tout d'abord DIEU de m'avoir accordée la chance de réaliser un rêve d'enfance, mes parents de m'avoir aimée, éduquée et soutenue, mon mari de m'avoir accompagnée durant cette longue aventure et mes petites perles qui n'avaient pas le choix d'avoir une maman qui étudie.

Je remercie mon directeur Daniel Lamarre pour son encadrement et surtout pour sa patience et sa confiance qui m'a encouragée à persévérer.

Je remercie Martin Baril qui m'a accompagnée avec une grande gentillesse dans mes premiers pas dans la recherche, de m'avoir encadrée, conseillée et soutenue avec générosité et pertinence durant mes premières années.

Je remercie tous les anciens et actuels membres du laboratoire notamment Laurent, Marie-ève, Bridget, Nicolas, Alex et Bassim. Vous avez marqué mon âme avec vos discussions et votre partage ce qui a donné un gout particulier à mon parcours et surtout à mon insertion dans une nouvelle société et culture.

Finalement, je remercie les responsables et employés des plateformes technologiques de l'institut en immunologie et cancer pour leur support technique et assistance qui ont rendu l'avancement de ce projet possible.

Avant propos

Les infections virales déclenchent une réponse inflammatoire innée dont l'amplitude et la durée représentent une tentative de l'organisme d'éliminer ou neutraliser l'agent pathogène, sans endommager les tissus du corps.

La capacité du système immunitaire innée à reconnaître et à éliminer les agents pathogènes a été majoritairement attribuée aux réactions immunitaires déclenchées par les récepteurs appelés PRRs (Pattern-Recognition Receptors). Toutefois, l'activation excessive de la signalisation des PRRs est associée à la pathogenèse de diverses maladies, d'où l'immense intérêt actuel à identifier et à comprendre les mécanismes de régulation de l'immunité innée.

Une des questions majeures dans ce domaine est de savoir comment équilibrer la réponse innée et la régulation négative pour maintenir l'homéostasie immunitaire. Ainsi, une armada de modulateurs de la signalisation des PRRs a été identifiée, notamment grâce aux études génomiques à haut débit. Cependant, l'action inefficace d'un modulateurs des PRRs peut entraîner une activation inappropriée (cas de régulateurs positifs) ou une suractivation (cas de régulateurs négatifs) de la signalisation des PRRs, entraînant ainsi des troubles inflammatoires. De plus, l'action de ces modulateurs fait engager des interactions complexes avec d'autres voies de signalisation, dans l'ultime but de fournir une réponse équilibrée.

Le laboratoire du docteur Daniel Lamarre a contribué à l'avancement des données sur la régulation de l'immunité innée en réalisant le premier criblage aux ARN interférant (ARNi) à l'échelle génomique, qui a permis l'identification de centaines de nouveaux régulateurs de l'interferon- β (IFN β) en réponse à l'infection par le virus à ARN Sendai (VS). Deux membres de la famille des WNTs ont été identifiés comme régulateurs négatifs de la transcription d'IFN- β . Cette découverte nous a incités à explorer la contribution de la voie de signalisation

WNT/CTNNB1 dans la régulation négative de la réponse innée aux virus à ARNs. Ainsi, dans la première partie de l'introduction, nous présenterons principalement les différents systèmes de reconnaissance du pathogène viral, leurs signalisations qui mènent à la production des IFNs de type I ainsi que la régulation associée à ces signalisations; tout en focalisant sur les mécanismes de régulation négative. Dans la deuxième partie, nous présenterons la signalisation de la voie WNT/CTNNB1, les mécanismes de régulations des fonctions de la CTNNB1 et les liens décrits dans la littérature entre la voie WNT/CTNNB1 et les voies de la réponse immunitaires innée face aux infections virales et bactériennes.

Chapitre I

I.1 Introduction (Partie A) : l'immunité antivirale innée

I.1.1 Présentation

Le système immunitaire dispose principalement de deux armes; l'immunité innée et l'immunité adaptative. Initialement, l'immunité innée était considérée comme non spécifique et moins complexe. Pourtant, cette notion a été communément écartée après la découverte révolutionnaire des récepteurs de type Toll (Toll-like receptor) vers les années 1990 [1]. Depuis, la signalisation émanant de l'immunité innée se démontre de plus en plus sophistiquée et indispensable à la réponse immunitaire contre un pathogène.

D'un point de vue fonctionnel, la réponse immunitaire innée peut être divisée en deux étapes distinctes : la reconnaissance et la réponse. La reconnaissance du pathogène est assurée par des les PRRs qui surveillent les espaces extra et intracellulaires à la recherche de signes d'infection, marqués par la présence de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) et des motifs moléculaires associés au danger (appelés DAMPs (Danger Associated Molecular Patterns). Alors que les DAMPs constituent des produits cellulaires générés en réponse au stress cellulaire, les PAMPs sont des motifs moléculaires hautement conservés entre les différentes classes de micro-organismes et sont essentiels à leur survie tout en étant distingués du soi [2].

Actuellement, plusieurs classes de PRRs sont identifiées et caractérisées de manière assez détaillées. Celles-ci comprennent les récepteurs de type Toll dits TLRs (Toll-like receptors), les récepteurs de type C-lectin dits CLR (C-type lectin receptors), les récepteurs de type NOD

dit NLRs (NOD-Like Receptors), les récepteurs de type RIG-I dits RLRs (RIG-I-like receptors) et d'autres récepteurs cytosoliques comme les récepteurs AIM-2 (appelés aussi ALRs (AIM-2 like receptors), ainsi que plusieurs enzymes qui fonctionnent comme des capteurs intracellulaires des acides nucléiques viraux incluant OAS et cGAS [3] (**Figure I.1**).

Au cours de l'infection virale, l'engagement des PRRs déclenche des cascades de signalisation cellulaires intrinsèques qui aboutissent à la production de nombreuses molécules de défense de l'hôte, dont les interférons (IFN) de type I et III, et d'une myriade d'autres cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines pour promouvoir un état antiviral intracellulaire. Les interférons et cytokines sécrétés amplifient et élargissent la réponse immunitaire innée par des actions autocrines et paracrines qui induisent l'expression de centaines de gènes stimulés par l'interféron (ISGs pour 'interferon stimulated genes'). Les ISGs assument un large éventail d'activités antivirales comme la perturbation des étapes cruciales du cycle de vie du virus, ou la modulation du cycle cellulaire et des états métaboliques cellulaires de manière à restreindre la réplication et la propagation virale [4].

Les cytokines et les chimiokines produites au cours de ces réponses agissent au niveau de l'interface entre les réponses immunitaires innée et adaptative en façonnant une réponse immunitaire adaptative efficace pour éliminer l'infection virale et favoriser la mémoire immunitaire [3].

Cependant, le dérèglement des réponses inflammatoires et l'activation aberrante des PRRs entraînent non seulement une infection chronique, mais également des troubles immunitaires tels

que les maladies auto-immunes, soulignant l'importance de la stricte régulation des PRRs et de la signalisation en aval dans la réponse innée.

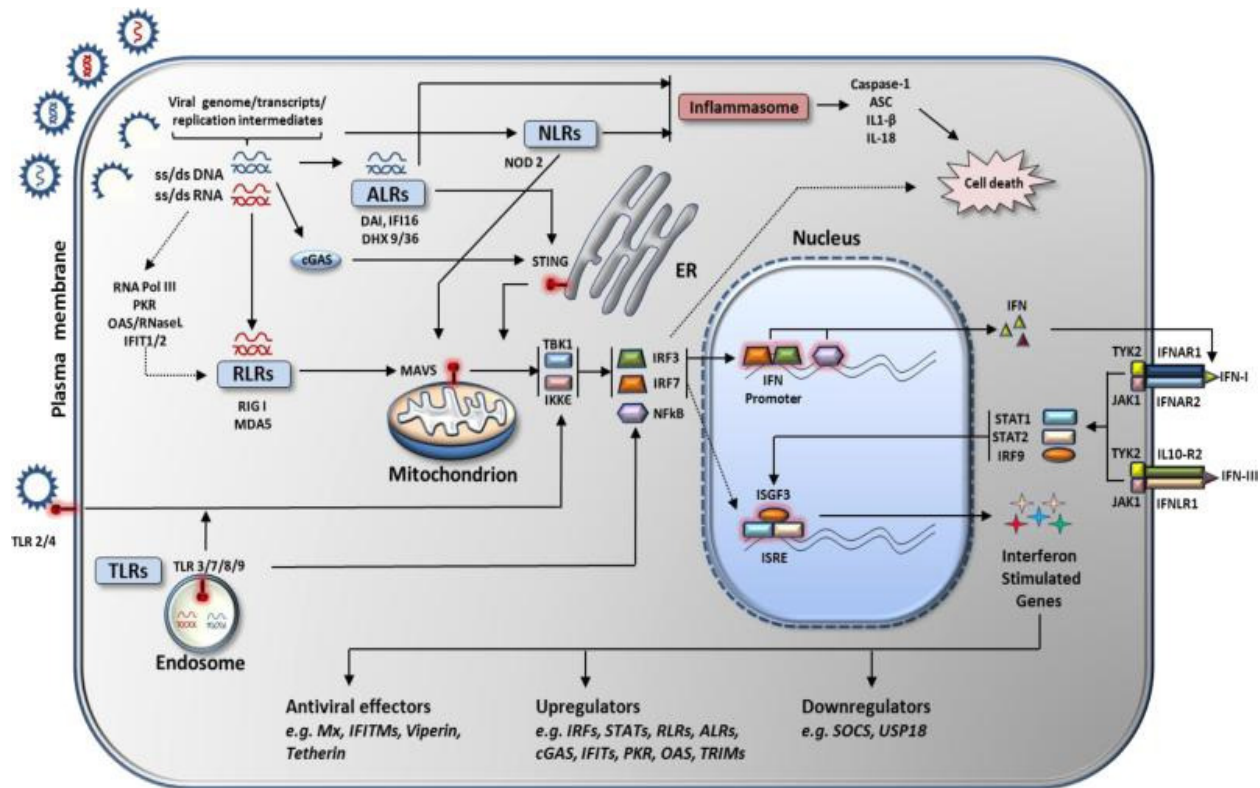


Figure I.1: Représentation schématique de la signalisation de l'immunité antivirale innée. Les acides nucléiques viraux sont reconnus par plusieurs types de récepteurs qui amorcent des signalisations aboutissant à la transcription des IFNs. Les IFNs sécrétés agissent par voie autocrine et paracrine pour activer une autre voie de signalisation qui permet la transcription des effecteurs antiviraux et des amplificateurs de la signalisation des IFNs. L'image est prise de [5]

I.1.2 Reconnaissance du pathogène viral par les TLRs

Cette famille renferme plus de 13 membres chez les mammifères, chacun étant spécialisé dans la détection de PAMPs différents. La majorité des TLRs est exprimée à la surface cellulaire. Les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 représentent une sous-famille de PRRs localisés dans les

compartiments endosomaux qui sont spécialisés dans la détection des ADNs et ARNs dérivés de virus et bactéries [6]. L'archétype du TLR est une protéine transmembranaire ayant un domaine extracellulaire (DEC) riche en Leucine appelé LRR (leucine-rich repeats) qui permet la reconnaissance des PAMPs, un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique que l'on retrouve chez les récepteurs de l'IL-1 et l'IL-18 appelé TIR (Toll interleukin (IL)-1 receptor) qui interagit avec les protéines adaptatrices requises pour amorcer la cascade de signalisation [7] (**Figure I.2**).

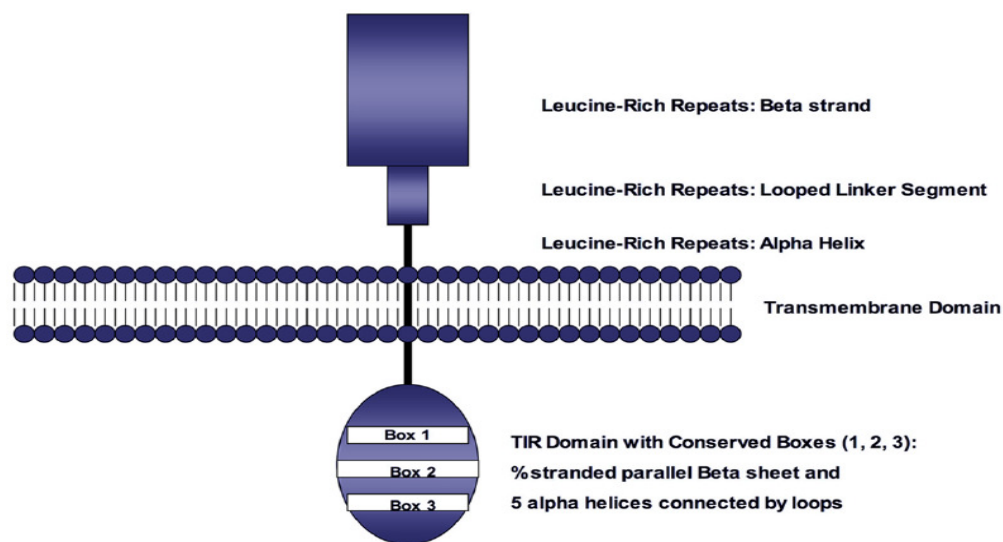


Figure I.2 : La structure des TLRs. Les TLRs sont des glycoprotéines membranaires. Les répétitions riches en leucine (LRR) sont impliquées dans la reconnaissance des PAMPs et la transduction du signal subséquente se fait à travers le domaine cytoplasmique Toll / IL-1R (TIR) qui est divisé en 3 boîtes conservées de taille variable et qui constituent des portions critiques de la molécule. Leurs chaînes latérales sont utilisées pour l'interaction avec les molécules d'adaptateur de signal en aval. L'image est prise de [8].

I.1.2.1 TLR3 : ligands et signalisation

Le TLR3 est hautement exprimé dans les cellules de l'immunité innée à l'exception des neutrophiles et plasmacytoides. TLR3 reconnaît un ARN double brin (ARNdb) provenant de génomes viraux, tels que les réovirus, et les ARNs intermédiaires générés lors de la réplication de différents virus, tels que le cytomégalovirus (CMV), le virus de l'herpès simplex 1, le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV), les flavivirus et les entérovirus [9].

TLR3 utilise la molécule adaptatrice TRIF pour activer la transcription des IFNs de type I [7]. Dans les cellules au repos, TLR3 réside au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Après stimulation par un ARNdb viral, TLR3 se lie à la protéine membranaire UNC-93B au RE pour se diriger aux endosomes. Dans les endosomes, le TLR3 est phosphorylé par la tyrosine kinase-Src, le récepteur du facteur de croissance épidermique et la 3-kinase phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate afin d'induire sa dimérisation et de déclencher la signalisation en aval. Le récepteur TLR3 activé recrute TRIF par une interaction entre les domaines TIR. L'interaction TLR3-TRIF crée des ramifications dans la voie de signalisation et active le facteur de transcription IRF3, NF- κ B et AP-1 [10] (**Figure I.3**).

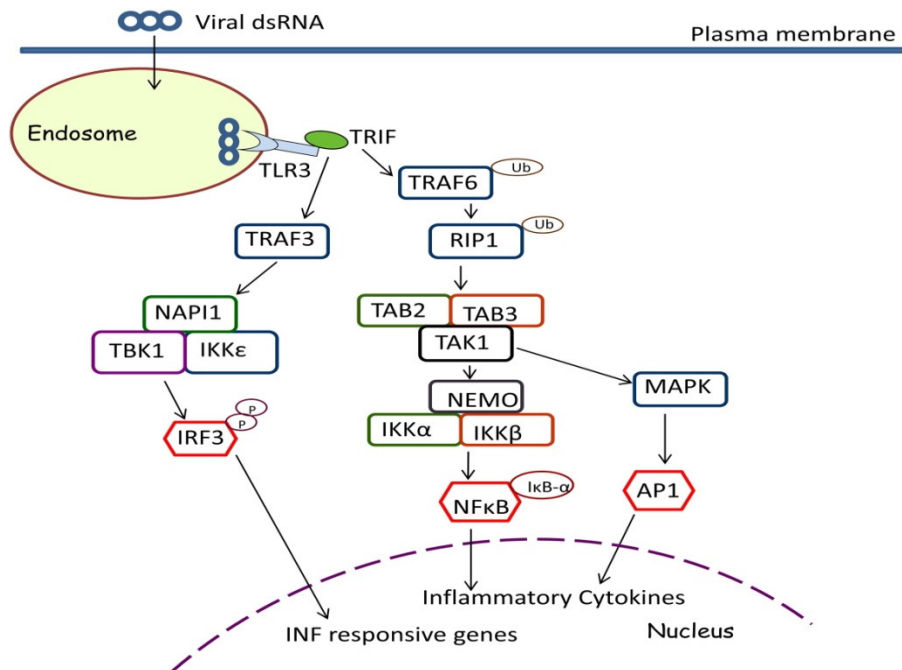


Figure I.3: Signalisation de TLR3. La voie de signalisation TLR3 est déclenchée par la liaison à l'ARNdb dans une membrane endosomale et par l'intermédiaire de l'adaptateur TRIF. L'interaction TLR3-TRIF et la signalisation en aval conduisent à l'activation d'IRF3, NF-κB et AP1. La phosphorylation d'IRF3 est médiée par deux kinases, TBK1 et IKKε, qui sont assemblées par la protéine d'échafaudage, NAPI1. TBK1 est associé à TRIF via TRAF3. L'IRF3 phosphorylé se déplace vers le noyau et induit l'expression de l'IFN-β et gènes dépendants de l'IFN-β. L'activation de NF-κB est médiée par RIP1 et TRAF6 dans certains types de cellules. RIP1 et TRAF6 recrutent TAB2, TAB3 et TAK1, qui phosphorylent deux kinases IKKα et IKKβ du complexe IKK (IKKα et IKKβ et NEMO). IKKβ phosphoryle en outre l'inhibiteur de NF-κB IκB, conduisant à sa dégradation et permettant la translocation nucléaire de NF-κB. Ce dernier induit l'expression de cytokines proinflammatoires. L'activation de la voie MAPK par l'intermédiaire du complexe TAK1 conduit à la phosphorylation et à la translocation nucléaire de l'AP-1, qui induit l'expression de cytokines proinflammatoires. L'image est prise de [10].

I.1.2.2 TLR7, TLR8 et TLR9: ligands et signalisation

TLR7 et TLR8 sont étroitement reliés et confinés au niveau du compartiment endosomal. Le TLR7 est principalement exprimé dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines et, dans une certaine mesure, dans les cellules T, les cellules B, les éosinophiles, les neutrophiles et

les monocytes/macrophages. TLR8 est exprimé dans les monocytes, les macrophages, les cellules T et surtout dans les cellules myéloïdes [11]. TLR7 et 8 sont similaires en termes de reconnaissance des ligands et au niveau de la signalisation intracellulaire. Les deux reconnaissent principalement les ARNs simple brin (ARNsb) riches en uridine et guanosine et sont activés par de petits agonistes moléculaires. Le Resiquimod (R848) et CL097 sont des agonistes à la fois pour TLR7 et TLR8, tandis que Imiquimod (R837) et Loxoribine sont uniquement pour TLR7 et CL075 (3M002) uniquement pour TLR8 [9].

En outre, TLR7 et TLR8 peuvent également reconnaître les ARNdb courts tels que les siARNs issus de l'interférence ARN (ARNi) et certains miARN tels que les miARN-21 et les miARN-29a sécrétés par les cellules tumorales [12]. Finalement les virus à ADN sont reconnus par TLR9. Cette détection dépend de la présence de motifs nucléotides CpG non méthylés qui se distinguent de l'ADN des mammifères ayant quatre fois moins de motifs CpG et sont peu méthylés [13] .

Suite à la stimulation par une infection ou par des agonistes, la conformation de TLR7, 8 et 9 change de telle sorte que les domaines TIR cytoplasmiques multimérisent et recrutent l'adaptateur MyD88. Ainsi, un complexe appelé Myddosome est formé impliquant IRAK4, IRAK1, TRAF6 et TRAF3 qui activent en aval les facteurs de transcription NF- κ B et IRF7 pour induire les cytokines proinflammatoires [14].

I.1.2.3 Régulation des TLRs

Compte tenu de leur rôle critique dans l'initiation de l'inflammation, la cascade de signalisation initiée par les TLRs est régulée à plusieurs niveaux. Les mécanismes de régulation peuvent être

classés dans plusieurs catégories, notamment leur trafic intracellulaire, la coopération avec des co-récepteurs, l'assemblage des complexes adaptateurs-kinases et la propagation du signal vers les facteurs de transcription. Ces processus sont régulés grâce à l'intervention de plusieurs régulateurs positifs et négatifs qui veillent à ce que l'intensité et la durée du signal TLR soient appropriées par rapport à une réponse anti-virale donnée.

Dans la catégorie des régulateurs positifs régulant le trafic des TLRs, on peut citer UNC93B qui est une protéine transmembranaire requise sélectivement pour le trafic de TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 du RE vers les endosomes [15, 16]. En absence de UNC93B, ces TLRs sont retenus au niveau du RE supportant son rôle de protéine d'échaffaudage [17]. Plus récemment, LRRC59 (Leucine-Rich Repeat Containing protein) est identifiée comme une autre protéine du RE qui coopère avec UNC93B dans le mouvement des TLRs qui reconnaissent les acides nucléiques [18]. Similairement, HRS (Hepatocyte growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate) est nécessaire pour le trafic de TLR7/9 vers les lysosomes [19]. Un rapport récent a décrit que l'Entérovirus 71 (EV71) induit l'expression de HRS qui corrèle avec l'activation de TLR7 chez les patients infectés. Les auteurs ont démontré que HRS améliore la formation du complexe de signalisation de TLR7 au niveau des endosomes ce qui induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires et les interférons, entraînant l'orchestration des réponses inflammatoires et immunitaires à l'EV71[20]. De même, TREML4 (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells) est nécessaire pour la réponse TLR7 en favorisant le trafic et la localisation de TLR7 et MyD88 au niveau des endosomes [21].

Dans la catégorie de co-récepteurs, HMGB1 a été décrit comme un co-récepteur de TLR9, car il est capable de se lier à l'ADN CpG, de le transporter dans des compartiments endosomaux et d'interagir avec TLR9 [22, 23]. Par la suite, il a été proposé que HMGB1 et des protéines étroitement apparentées puissent fonctionner comme des sentinelles universelles non spécifiques pour les acides nucléiques et comme co-récepteurs pour TLR3, TLR7 et TLR9 [24]. Mex3B est également une protéine qui favorise la liaison du ligand viral et le clivage protéolytique du TLR3 dans les endosomes, entraînant l'activation complète du TLR3 [25]. Cette étude ainsi que d'autres rapports décrivant des co-récepteurs des TLRs comme CD14 et LL-37 [26] soulignent la nécessité d'un certain nombre de co-récepteurs et de molécules accessoires distincts pour des ligands individuels pour l'activation des TLRs.

Dans la catégorie de régulateurs au niveau de la signalisation, il y a par exemple STRAP qui fonctionne en tant que protéine d'échafaudage en favorisant l'assemblage de l'axe TAK1-IKK-NF- κ B ainsi que de l'axe TBK1-IRF3 pour activer la transcription de l'IFN- β médiée par l'activation de TLR3 [27]. Mint3 (Munc18-1-interacting protein 3) qui active la signalisation TLR3 en induisant la polyubiquitination de TRAF3 [28] et Sam68 qui est requise pour l'activation de NF- κ B en réponse à l'induction de TLR3 [29].

D'autre part, les régulateurs négatifs jouent un rôle critique dans l'homéostasie de la réponse des TLRs et sont impliqués à plusieurs niveaux.

Au niveau des TLRs et de leurs adaptateurs; on peut citer Triad3A (RNF216) qui est une E3 ubiquitine ligase qui s'associe avec TLR3, TLR4 et TLR9 induisant leur dégradation par le protéasome [30]. La E3 ligase TRIM8 (Tripartite motif 8) régule négativement la signalisation

TLR3 en induisant la polyubiquitination de TRIF de telle sorte à bloquer son interaction avec TBK1[31]. Aussi dans la même famille de protéine, TRIM38 cible TRIF pour la dégradation par le protéasome [32]

Au niveau de l'activation du facteur de transcription NF- κ B médiée par TLR3, SENP2 (SUMO-specific protease 6) empêche l'activation de NF- κ B en catalysant la sumoylation de NEMO, inhibant ainsi la transcription des gènes pro-inflammatoires [33]. SIRT6 cible le domaine de liaison de NF- κ B bloquant ainsi la transcription des cytokines inflammatoires en réponse à l'infection par le virus Dengue [34]

Il est important de noter que de plus en plus, il y a l'émergence d'autres types de régulations négatives comme au niveau transcriptionnel des TLRs. TLR7 illustre bien cet exemple car c'est bien connu que la duplication du gène TLR7 peut conduire à des maladies auto-immunes [35, 36]. Récemment, il a été démontré qu'un biais de codon sous-optimal du gène Tlr7 le protège contre une expression excessive en ayant un impact négatif sur la transcription et la traduction de Tlr7 [37].

I.1.2.4 Les TLRs : cible importante dans les thérapies anti-virales

Dans le passé, la recherche de thérapies antivirales était principalement axée sur les cibles virales. Au fur et à mesure que la recherche de thérapies antivirales efficaces se poursuit, les cibles cellulaires deviennent plus courantes, entraînant avec elles une variété de défis et de préoccupations. Les récepteurs TLRs ont fourni un premier choix très prometteur dans le traitement contre les infections virales. Ainsi, plusieurs agonistes de TLRs sont approuvés en thérapies cliniques tandis que d'autres progressent dans les phases cliniques. Par exemple,

imiquimod est approuvé depuis plusieurs années comme traitement topique contre les verrues associées au virus du papillome humain (HPV) [38]. D'autres agonistes de TLR7/8 se sont aussi révélés prometteurs dans l'inhibition de la réplication VIH (virus de l'immunodéficience humaine) et de VHB (virus de l'hépatite B), le virus ZIKA et contre l'infection par les norovirus [39-42]. Le poly I:C qui est un agoniste de TLR3 qui a largement été utilisé comme un stimulant immunitaire protecteur contre le VHB, le VIA (virus de l'influenza A) les coronavirus et certaines souches du VIH [43]. D'autre part, plusieurs de ces agonistes des TLRs sont utilisés comme des adjuvants de vaccins. Comme les oligonucléotides CpG (agonistes de TLR9) qui ont été utilisés dans diverses préparations de vaccins contre le VHB, le VIH et l'influenza [43].

I.1.3 Reconnaissance du pathogène viral par les RLRs

I.1.3.1 Structure et ligands

Cette famille comprend trois membres: retinoic acid inducible gene I (RIG-I), melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5) et laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). Les RLRs sont exprimés dans toutes les cellules incluant les cellules myéloïdes, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules du système nerveux central [1]. Leur expression est hautement induite par les IFNs.

Structurellement, ces protéines cytoplasmiques sont similaires et renferment trois domaines distincts: l'extrémité amino-terminale contient une répétition de domaines d'activation et de recrutement appelés C, un domaine hélicase central de type DEAD box et un domaine régulateur C-terminal appelé CTD responsable de la spécificité d'attachement aux ARNs viraux, incluant

les ARNdb et les ARNsb à extrémité 5'PPP. LGP2 est homologue de RIG-I et MDA5 mais ne contient pas de domaines CARD dans son extrémité amino-terminale. De plus, LGP2 régule les fonctions de RIG-I et MDA5 (**Figure I.4**) [2].

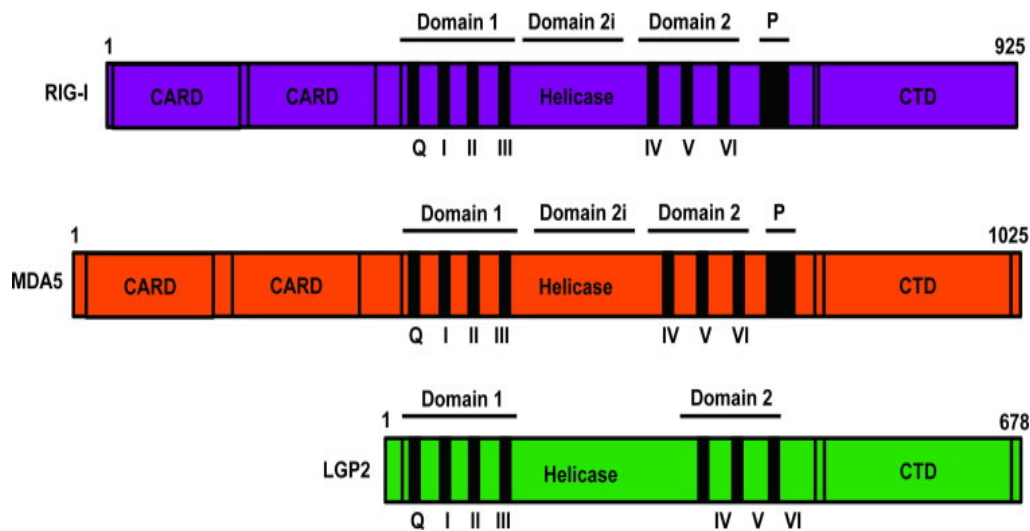


Figure I.4 : Représentation schématique des domaines structuraux des RLRs. Les trois RLRs sont des hélicases de type SF2 composées d'un domaine central de type DECH-box hélicase contenant les domaines conservés Hel1 (motifs Q, I, II et III) et Hel2 (motifs IV, V, VI). Entre les deux domaines hélicase se trouve le domaine d'insertion Hel2i nécessaire à l'autorégulation de RIG-I. MDA-5, RIG-I mais pas LGP2 possèdent deux domaines d'activation et de recrutement CARDS qui sont essentiels à l'interaction avec MAVS et l'initiation de la signalisation en aval. L'image est prise de [44]

Ces protéines interagissent avec l'ARN viral à travers leur domaine hélicase. La surexpression du domaine CARD de RIG-I est suffisante pour induire le promoteur de l'IFN- β indiquant que c'est le domaine impliqué dans l'activation de la signalisation en aval. Le CTD de RIG-I renferme un domaine de répression (RD) dont la délétion provoque l'activation constitutive du promoteur de l'IFN- β tandis que sa surexpression empêche la signalisation suite à l'infection par

le virus de l'hépatite C [45]. Le rôle fonctionnel de RIG-I et MDA5 *in vivo* a été considérablement éclairci grâce à la génération de souris déficitaires [46-48]. Des études de souris RIG-I^{-/-} et MDA5^{-/-} ont révélé que ces deux détecteurs reconnaissent différents virus à ARN. RIG-I reconnaît des virus appartenant aux différentes familles Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae et Flaviviridae. Ainsi les cellules déficitaires de RIG-I produisent nettement moins d'IFN de type I et de cytokines proinflammatoires en réponse aux virus de la maladie de Newcastle (VMN), le virus Sendai (VS), le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) et le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), virus de l'influenza A et le virus Ebola [2]. Les études menées sur les souris déficitaires en MDA5 ont montré que ces derniers ne répondent pas efficacement aux virus de l'encéphalomyocardite (EMCV), virus de Theiler et le virus Mengo, indiquant que MDA5 est plus susceptible de reconnaître les virus de la famille Picornaviridae.[49]. Il a été aussi démontré que MDA5 joue un rôle critique dans la réponse IFN de type I suite à l'infection par le VHC [50]. De plus, il y a des virus qui peuvent être conjointement reconnus par RIG-I et MDA5 comme le virus de la Dengue (DENV) et le virus du Nil occidental (VNO) [51, 52].

La spécificité de reconnaissance du ligand par MDA5 et RIG-I est attribuée au fait que RIG-I reconnaît préférentiellement l'ARNdb ayant une courte structure (moins de 2kb) ainsi qu'une extrémité 5' tri-phosphate, tandis que MDA5 reconnaît l'ARNdb de taille supérieure à 2kb ayant des extrémités franches comme l'ARN synthétique poly I:C [53]. Les structures d'ARN reconnues par LGP2 sont moins bien connues. LGP2 a été initialement discerné comme un régulateur de RIG-I et MDA5 [45, 54]. Ainsi, les études initiales ont démontré que la

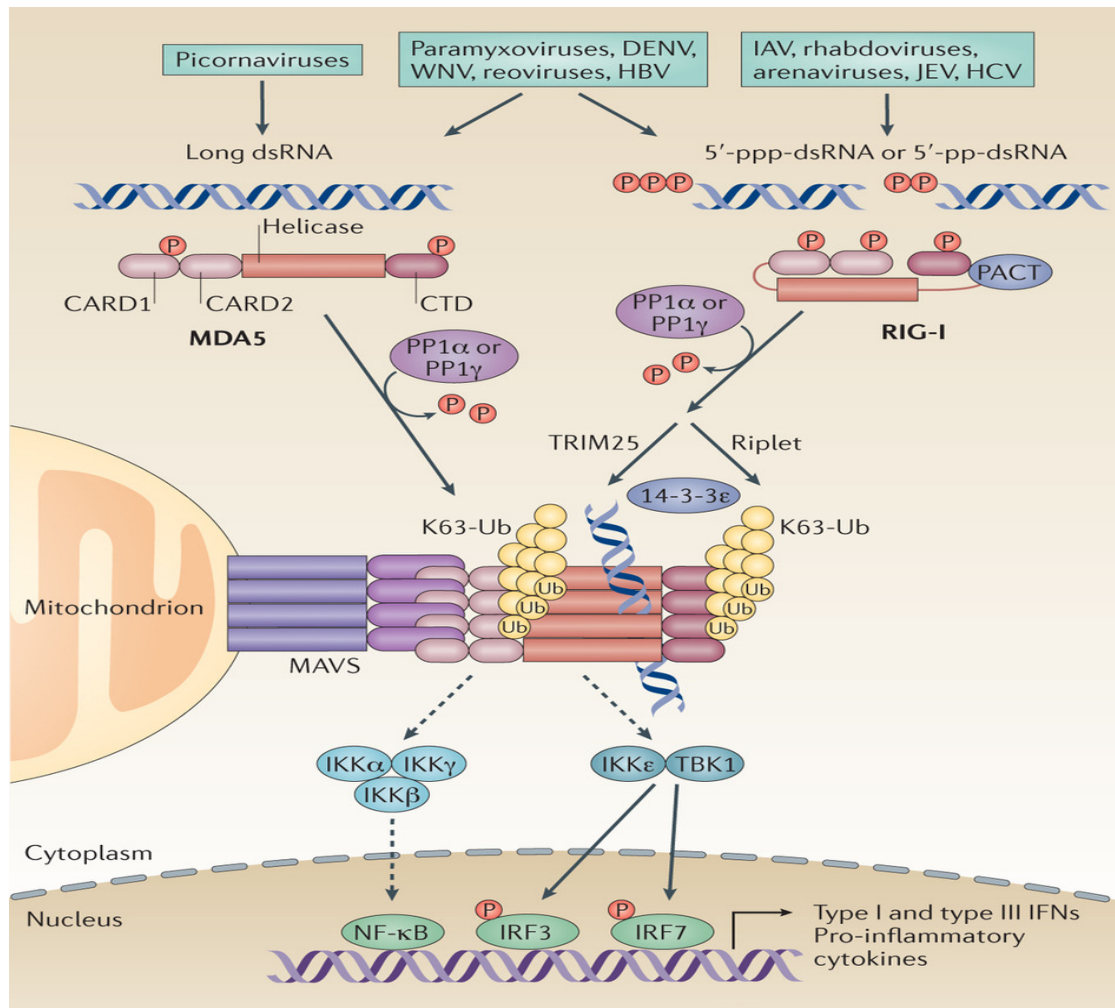
surexpression de LGP-2 diminue la capacité du VS et VMN à induire la production d'IFN en agissant comme un régulateur négatif. Toutefois, les études *in vivo* de souris déficitaires de LGP-2 ont montré qu'il agit comme régulateur positif de la signalisation émanant de RIG-I et MDA5 lors de l'infection par leur virus à ARN respectif. Ce phénotype est consistant avec la théorie que LGP-2 augmente l'accessibilité et l'interaction des PAMPs dérivant d'acides nucléiques viraux avec RIG-I et MDA5 afin de promouvoir la reconnaissance et par conséquent l'activation de la voie [2]. En accord avec ce modèle, il a été récemment montré que LGP2 s'associe avec Dicer afin d'inhiber le clivage des ARNdb au ARNsb. Cette action permet de préserver le substrat viral pour une meilleure reconnaissance par les RLRs [55].

I.1.3.2 Les plateformes de signalisation de MAVS se produisent dans des organites distincts

Contrairement aux TLRs, localisés au niveau de la membrane plasmique ou des endosomes, les RLRs cytosoliques utilisent les mitochondries, la membrane associée aux mitochondries (MAM) et les peroxisomes comme plateformes de signalisation [56].

Dans les cellules non stimulées, RIG-I est séquestré dans le cytoplasme dans une conformation inactive dite 'close' résultant de son auto-inhibition par des interactions intramoléculaires entre les domaines de régulation (RD) et hélicase/CARD [2]. Suite à la détection de l'ARNv double brin, RIG-I et MDA5 subissent plusieurs MPTs comme la sumoylation par la E3 SUMO ligase TRIM38[57], la déphosphorylation par la phosphatase PP1[58], la déacétylation de RIG-I par HDAC6[59] et la polyubiquitination de type k63 principalement par TRIM25 pour RIG-I et TRIM65 pour MDA5[60]. Ces processus conduisent à des changements conformationnels des RLRs, à leur oligomérisation puis translocation vers la mitochondrie où ils interagissent avec

MAVS (Mitochondrial AntiViral Signaling) aussi appelé VISA (Virus-Induced Signaling Adptator), CARDIF (CARD Adapter Inducing IFN- β) et IPS-1 (IFN- β Promoter Stimulator-1) [2], via leurs domaines CARD[2]. Ces associations entraînent l'agrégation des mitochondries pour former une structure ronde autour du noyau, MAVS subit aussi un changement conformationnel et forme de larges agrégats ressemblant à des prions au niveau de la membrane mitochondriale [61]. Ces agrégats contiennent d'autres molécules comme WDR5, WHIP, TRIM14, and PPP6C pour un assemblage optimal du complexe MAVS [62, 63]. Par la suite, plusieurs E3 ligases sont recrutées au complexe MAVS, incluant TRAF2/3/6, cIAP1/2, et TRIM31. Les chaînes de polyubiquitine de type K63 attachées aux complexes associés à MAVS sont reconnues par NEMO/IKK γ , qui à son tour recrute des complexes TBK1/IKK ϵ -TANK et IKK α / β / γ ainsi que les facteurs de transcription IRF3/7 et NF- κ B [56]. Plusieurs régulateurs positifs régulent ces processus comme la kinase GSK3 β qui favorise l'oligomérisation et l'autophosphorylation de TBK1 [64], MSX1 qui facilite l'assemblage du NEMO/TBK1/IKK ϵ -TANK [65]. Dans ce complexe, TBK1 et IKK α / β activés phosphorylent et activent IRF3/7 et NF- κ B, respectivement, suivi de leur libération des mitochondries et translocation dans le noyau pour induire la transcription des IFNs de type I et des cytokines pro-inflammatoires [56] (**Figure I.5**).



Nature Reviews | Microbiology

Figure I.5 : Signalisation des RLRs. RIG-I et MDA5 restent inactifs dans les cellules non infectées à travers la phosphorylation de leurs domaines; caspase d'activation, CARD de recrutement et leurs extrémités C-terminales (CTD). De plus, RIG-I adopte une conformation auto-inhibée dite «close». À la suite d'une infection virale, RIG-I reconnaît l'ARNv (db) cytoplasmique qui contient un fragment 5'-triphosphate ou 5'-diphosphate, tandis que MDA5 détecte de longues structures d'ARNdb. Suite à la liaison de l'ARNv, RIG-I et MDA5 sont déphosphorylés par PP1α ou PP1γ, ce qui induit la formation d'une conformation CARD active. RIG-I est ensuite activé par l'ubiquitination K63 de ses domaines CARD par TRIM25. Riplet, est une autre E3 ubiquitine ligase qui ubiquitine RIG-I au niveau du CTD, ce qui est également crucial pour son activation. Ces MPTs et autres non illustrées induisent l'oligomérisation de RIG-I (la forme active de signalisation de RIG-I), qui interagit ensuite avec MAVS au niveau des mitochondries, des membranes associées aux mitochondries (MAMs) ou des peroxysomes (non-

illustré dans la figure)). La protéine chaperone 14-3-3ε ciblant les mitochondries est essentielle pour la translocation de RIG-I vers MAVS mitochondrial. Dans le cas de MDA5, la liaison à un long ARNdb induit la formation de filaments de MDA5, ce qui permet ensuite à MDA5 de se lier à MAVS. Les complexes associés à MAVS activent TBK1/IKKε ainsi que le complexe IKKα – IKKβ – IKKγ, qui activent respectivement IRF3/IRF7 et NF-κB à travers les événements de phosphorylation. IRF3 et/ou IRF7 et NF-κB conjointement avec AP-1 (AP1; non illustrée) induisent l'expression des IFNs de type I, les IFNs de type III et de nombreux autres cytokines pro-inflammatoires pour établir un état antiviral. L'image est prise de [66]

En plus des mitochondries, les MAMs et les peroxisomes sont aussi impliqués dans la signalisation des RLRs [67, 68]. Les MAMs représentent les structures formées par l'association de la membrane externe de la mitochondrie avec la membrane du RE. Les MAMs servent de plateforme de signalisation optimale pour plusieurs processus physiologiques tels que l'apoptose, l'autophagie et la régulation de la réponse antivirale innée [67]. Par exemple, durant l'infection par le VHC, RIG-I s'accumule préférentiellement au niveau des MAMs afin de faciliter son interaction avec MAVS. Ainsi, la protéase NS3/4A de VHC clive MAVS au niveau des MAMs pour échapper à la réponse immunitaire innée [69] (**Figure I.6**).

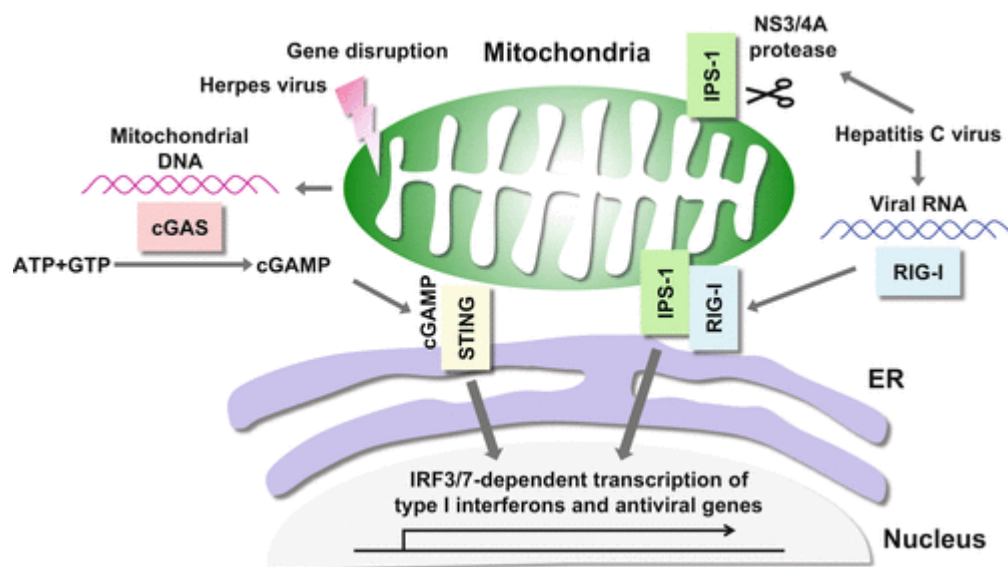


Figure I.6: Le MAM fonctionne comme une plateforme pour le système immunitaire antiviral inné. Lors d'une infection par le VHC, RIG-I est recruté dans le MAM pour interagir avec MAVS, entraînant l'activation des voies de signalisation en aval. Le MAM est impliqué aussi dans l'activation de la voie cGAS-STING suite à l'infection par le virus de l'herpès. L'image est prise de [69].

Le peroxyosome est un organe cellulaire entouré d'une membrane simple, qui est impliqué dans la métabolisation des acides gras et des acides aminés, la réduction de dérivés réactifs d'oxygène et la synthèse des plasmalogènes [70]. Les peroxyosomes constituent une plateforme importante dans la réponse antivirale innée. Les virus à ARN induisent une signalisation anti-virale de MAVS situé au niveau des peroxyosomes pour l'induction des effecteurs anti-viraux précoces mais pas des IFNs de type I. La signalisation de MAVS mitochondriale quant à elle, active plus tardivement les voies dépendentes des IFNs [68]. De plus, il a été démontré que les peroxyosomes représentent le site primaire qui induit l'expression sélective des IFNs de type III suite à l'activation de la voie RLR-MAVS [71], soulignant l'implication de cette organelle dans la régulation de l'expression des IFNs de type I et III.

I.1.3.3 Régulation de la signalisation des RLRs

La signalisation des RLRs est complexe et nécessite l'implication de plusieurs mécanismes de régulation afin de prévenir une réponse prolongée ou excessive. Tandis que des boucles de rétrocontrôle positif mènent à l'induction rapide des IFNs de type I suite à l'infection virale, plusieurs régulateurs négatifs sont disposés à plusieurs niveaux le long de la cascade de signalisation pour limiter la réponse. Dans cette section, nous nous focaliserons sur les mécanismes de régulation négatifs de la signalisation des RLRs.

I.1.3.3.1 Régulation au niveau de la reconnaissance

La reconnaissance du pathogène viral représente un premier niveau de contrôle, et les MPTs subies par les RLRs sont cruciales dans ce processus de régulation. La régulation par ubiquitination est le mécanisme le mieux défini. Ainsi, les activités de RIG-I et MDA5 sont négativement régulées par RNF125 qui génère la poly-ubiquitination de leurs domaines CARD afin de les cibler vers la dégradation par le protéasome [72]. D'une façon similaire, il a été récemment démontré que RNF122 mène à la dégradation protéasomale de RIG-I en lui délivrant les chaînes K48 [73]. TRIM20 se lie à RIG-I et MDA5 et favorise leur polyubiquitination de type K27 et K48 promouvant leur dégradation [74]. MLL5 (Mixed Lineage Leukemia 5) permet l'association entre RIG-I et la E3 ligase STUB1 qui conduit à l'ubiquitination et la dégradation de RIG-I [75]. Le complexe LUBAC (Linear Ubiquitin assembly complex) a également été proposé comme régulateur négatif de la signalisation des RLRs en adoptant deux mécanismes d'action indépendants [76]. Le premier implique une compétition avec TRIM25 pour l'interaction avec RIG-I afin d'empêcher l'interaction entre RIG-I et MAVS. Le deuxième promouvait la poly-ubiquitination de type M1 et K48 de TRIM25 induisant ainsi sa dégradation protéasomale. À l'inverse de l'ubiquitination, le désassemblage des chaînes d'ubiquitin de type K63 attachées à RIG-I (pour favoriser son activation), régule négativement son activité. Les déubiquitinases CYLD (cylindromatosis) et les USPs (ubiquitin-specific protease) 3, 21, 25 et 15 ciblent RIG-I entraînant la diminution de la réponse IFN [77-81]. Outre la dégradation par le protéasome, il a été démontré récemment que RIG-I peut être dégradé par le système d'autophagie sélective. Dans ce sens, LRRC25 (Leucine-Rich Repeat Containing protein) est

identifié comme une protéine s'associant avec RIG-I couplé à ISG15 afin de promouvoir son interaction avec le récepteur autophagique p62 [82].

Outre les MPTs, d'autres mécanismes de régulation négative ont été découverts. Par exemple FAT10 (HLA-F Adjacent Transcription 10) s'associe avec les domaines CARD de la forme active de RIG-I, engendrant sa séquestration loin de la plateforme de signalisation au niveau de la mitochondrie [83]. La protéine ARL5B (ADP-Ribosylation Factor-Like protein 5B) régule négativement l'activité de MDA-5 en s'associant avec son domaine C-terminal interférant ainsi avec sa capacité à reconnaître l'ARN [84]. Plus récemment, une autre stratégie d'inactivation de RIG-I a émergé à travers la reconnaissance de l'ARN du soi [85]. En effet, cette étude a illustré que dans la phase tardive d'infection virale, le long ARN non-codant lnc-Lsm3b entre en compétition avec l'ARNv afin de stabiliser la forme inactive de RIG-I [85].

I.1.3.3.2 Régulation au niveau de la transduction du signal

Étant donné que MAVS coordonne l'activation de la voie d'IFN de type I à partir des deux PRRs centraux RIG-I et MDA-5, plusieurs mécanismes de modulation négative de son activité sont décrits. Parmi lesquels on note des MPTs, le changement dans la dynamique mitochondrial, des interactions protéine-protéine et la dégradation autophagique. Plusieurs E3 ligases interagissent avec MAVS suite à l'infection virale, parmi lesquelles on note RNF125 [72], MARCH5 [86], SMURF2 (Smad ubiquitin regulatory factor 2)[87] et AIP4 (atrophin-1-interacting protein 4) [88]. Toutes ces protéines facilitent l'ubiquitination menant à la dégradation de MAVS afin de prévenir une réponse inflammatoire excessive de l'hôte. Dans la régulation par la déphosphorylation, PPM1A (Protein Phosphatase Magnesium-dependent 1A) est décrite comme

la première phosphatase de MAVS qui élimine la phosphorylation induite par TBK1 atténuant ainsi la réponse antivirale [89].

D'autres protéines s'associent avec MAVS pour réduire la formation de la plateforme de signalisation en aval ; par exemple: l'interaction de NLRX1 avec MAVS empêche le recrutement de RIG-1 et MDA-5 activés [90]. De même, NLRP11 est un ISG qui se déplace vers les mitochondries pour utiliser la plateforme MAVS pour dégrader TRAF6 [91]. ASC (Apoptosis Speck-like protein) est une protéine adaptatrice du complexe de l'inflammasome, qui inhibe la transcription d'IFN- β en interagissant avec MAVS [92]. UBXN1 interfère avec l'oligomérisation de MAVS prévenant ainsi la formation du complexe MAVS/TRAF6/TRAF3 [93]. La protéine mitochondriale LRPPRC (Leucine-rich PPR motif-containing protein) inhibe également l'association de MAVS avec TRAF3 et TRAF6 durant l'infection par VHC [94].

MiniMAVS qui est un variant tronqué de MAVS généré par la traduction alternative a été montré comme un antagoniste de la fonction de MAVS (variant complet) [95]. Cette étude souligne un potentiel considérable des ARNm polycistroniques dans la régulation des fonctions de l'immunité innée.

Finalement, BST2 (Bone marrow stromal antigen 2) est un ISG qui recrute la E3 ligase MARCH8 pour catalyser l'ubiquitination de MAVS et qui la cible pour la dégradation autophagique [96, 97].

I.1.3.3.3 Régulation au niveau des facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B

Plus en aval dans la cascade de signalisation, les facteurs de transcription IRF3 et NF- κ B sont régulés de diverses façons. Encore une fois, les MPTs comme la phosphorylation/déphospho-

orylation et la polyubiquitination sont présents. MST1 phosphoryle IRF3 aux résidus Thr75 et Thr253, ce qui abolit l'homodimérisation d'IRF3 active et son recrutement sur la chromatine [98]. À l'inverse, FBXO17 réduit la dimérisation et la translocation nucléaire d'IRF3. Cet effet résulte du recrutement de la phosphatase PP2A (protein phosphatase 2) qui entraîne la déphosphorylation d'IRF3 [99]. De même, la déphosphorylation d'IRF3 dans les positions Ser385 et Ser396 par la phosphatase PP1 supprime la production d'IFN β 1 médiée par les TLRs et les RLRs [100]. D'autre part, la E3 ligase c-Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) promouvoit la polyubiquitination K48 et la dégradation protéasomale d'IRF3 [101]. LRRC25 inhibe la signalisation de NF- κ B en ciblant p65 vers la dégradation autophagique [102]. INK160 interagit avec IKK α/β et TBK1/IKK ϵ afin de bloquer le recrutement et la phosphorylation de p65 et d'IRF3 [103]. De même SAMHD1 inhibe l'activation de NF- κ B en interagissant avec I κ B α [104].

I.1.4 Reconnaissance du pathogène viral par des récepteurs cytosoliques autres que les RLRs

I.1.4.1 Les sentinelles - ARN hélicases de type DDX

Outre les hélicases RLRs dont la fonction est bien définie dans la détection de l'ARNv, d'autres protéines cytoplasmiques ont révélé leur pouvoir à se lier à l'ARNv et à promouvoir les cascades de signalisation anti-virales. Parmi ces protéines on trouve DDX3 qui se lie à l'ARNv et à polyI:C, forme un complexe avec MAVS et induit la transcription de l'IFN- β [105]. L'hélicase DDX60 peut également se lier à l'ARNv ainsi qu'aux RLRs. Il en résulte l'augmentation de l'interaction RIG-I-ARNv et la production des cytokines antivirales [106]. Un complexe

constitué de DDX1, DDX21 et DDX36 est finalement rapporté pour détecter l'ARNv spécifiquement dans les cellules myéloïdes, d'une façon indépendante de la voie des RLRs afin d'induire les IFNs [107]. Il a été proposé que les hélicases DDX qui sont pour la majorité exprimées d'une façon constitutive, reconnaissent l'ARNv dans les étapes précoces de l'infection quand l'abondance des RLRs est encore faible [108].

Plus récemment, notre laboratoire a révélé que SNRNP200, qui est aussi une ARN hélicase cruciale pour le processus d'épissage de l'ARN, joue un rôle immuno-régulateur important dans la détection de l'ARN viral et dans la promotion IRF3-dépendante des réponses immunitaires innées antivirales [109].

I.1.4.2 L'inflammasome

L'inflammasome est une plateforme moléculaire composée classiquement d'un récepteur NLR tels que NLRP3 ou NLRP1b, de la protéine adaptatrice ASC et d'une protéine adaptatrice de la famille des caspases. Il joue un rôle essentiel dans le déclenchement de la réponse inflammatoire qui mène à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β [110]. Plusieurs membres de la famille des NLRs sont impliqués dans l'activation de l'immunité innée induite par l'ARNv [111]. Toutefois, ce n'est pas bien élucidé si ces molécules peuvent reconnaître et lier directement l'ARNv. L'avancement récent des données démontre par contre qu'elles sont activées indirectement en intégrant les signaux générés par l'ARNv lors d'une infection. Plus spécifiquement, l'activation NLRP3 suite à l'infection par un virus à ARN via son interaction avec RIP1/3 (receptor-interacting proteins 1 et 3) résulte en l'activation de l'inflammasome

[112]. De plus, NLRX1 est activée par les virus à ARN induisant l'activation de MAVS, mais contrairement à NLRP3, NLRX1 semble avoir la capacité à lier directement l'ARNv [111, 113].

I.1.4.3 Reconnaissance des motifs d'ADN de virus pathogènes

Il est reconnu depuis longtemps que l'ADN résultant d'une infection virale ou bactérienne ou introduit par transfection peut déclencher l'immunité innée. Des efforts considérables ont été déployés afin d'élucider les acteurs cellulaires intervenant dans cette réponse. Ainsi plusieurs détecteurs de l'ADN viral (ADNv) ont été découverts en plus de l'adaptateur crucial STING (aussi appelé MITA, MPYS ou ERIS) qui intègre la majorité des signaux émanant des récepteurs pour déclencher les événements en aval [114] (**Figure I.7**).

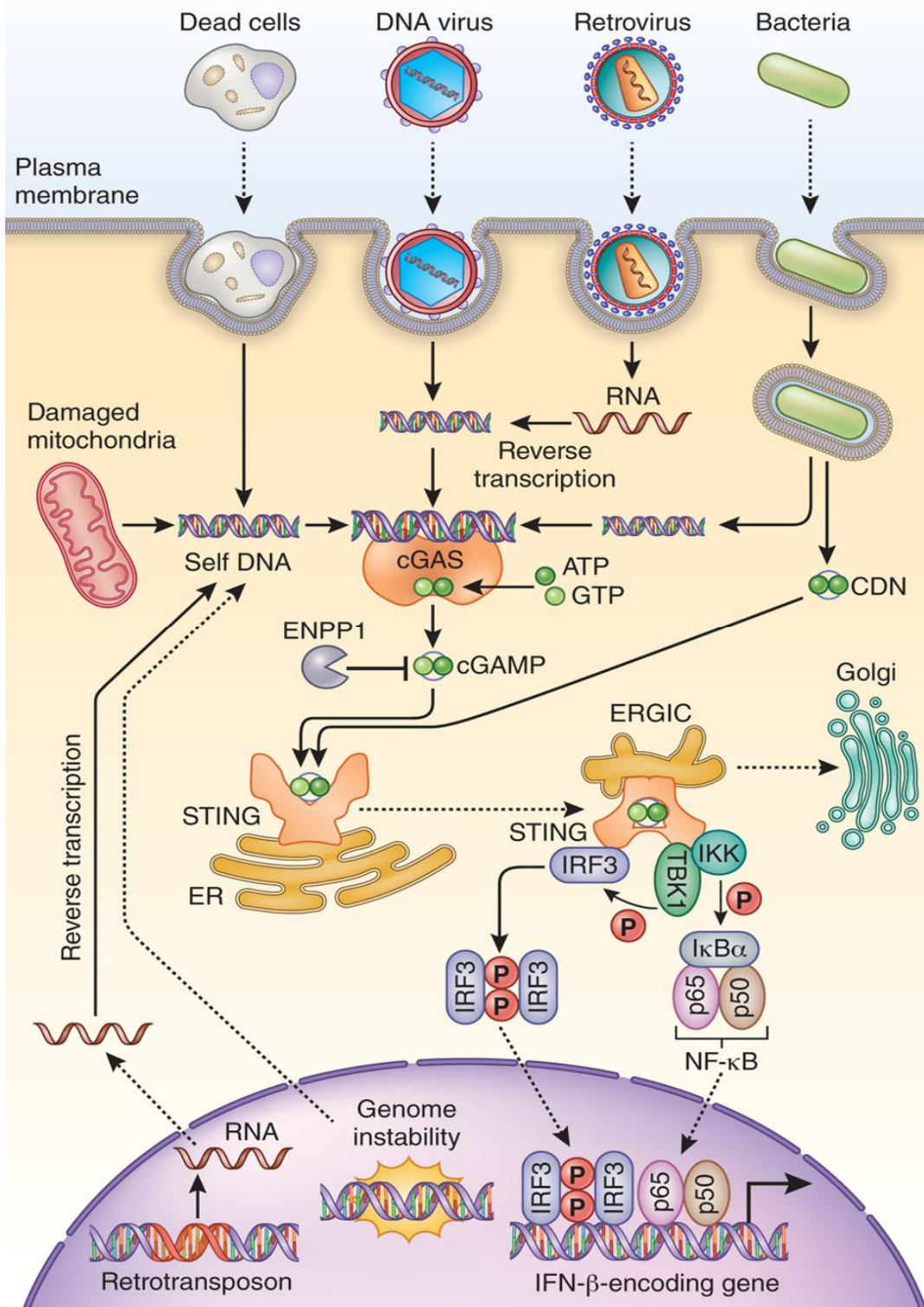


Figure I.7 : Reconnaissance de l'ADN par cGAS-STING. L'ADN est un PAMP lorsqu'il est transmis au cytoplasme de l'hôte par une infection microbienne. Il s'agit d'un DAMP lorsqu'il pénètre dans le cytoplasme à partir du noyau, des mitochondries ou des cellules mortes. L'ADN cytosolique se lie à et active cGAS, qui catalyse la synthèse de 2'3'-cGAMP à partir d'ATP et de GTP. 2'3'-cGAMP se lie à l'adaptateur STING, qui achemine vers le compartiment intermédiaire ER-Golgi (ERGIC) et l'appareil Golgi. STING active alors IKK et TBK1. TBK1 phosphoryle STING, qui à son tour recrute IRF3 pour la phosphorylation par TBK1. IRF3 phosphorylé se dimérise puis pénètre dans le noyau, où il fonctionne avec NF- κ B pour activer l'expression des interférons de type I et d'autres molécules immunomodulatrices. L'image est prise de [115].

Récemment, une étude cruciale a déterminé que la synthase (cGAS) agit comme un détecteur de l'ADNv, fournissant ainsi le second messenger requis pour activer STING [116]. En effet, se liant à l'ADNv dans le cytoplasme, cGAS synthétise la molécule cyclique di-GMP-AMP (c-di-GAMP) à partir du GTP et ATP qui se lie à STING pour activer IRF3 et la production d'IFN- β . La synthase cGAS lie l'ADN indépendamment de sa séquence à travers son domaine N-terminal et active la synthèse de c-di-GAMP. Suite à la production de c-di-GAMP, le complexe c-di-GAMP-STING dimérise et est transloqué du RE vers l'appareil de Golgi dans des structures périnucléaires où il se lie à TBK1 [117]. Comme adaptateur, STING facilite le recrutement d'IRF3 vers TBK1 ainsi que sa phosphorylation. De plus, il a été rapporté que STING parvient à activer NF- κ B [115, 118].

Toutefois, avant la découverte de cGAS, d'autres protéines ont été proposées comme détecteurs d'ADN. Parmi lesquelles on peut citer IFI16 qui fait partie des AMLs (AIM2-like proteins). Récemment, il a été démontré qu'IFI16 coopère avec cGAS dans les macrophages à deux niveaux; la déplétion d'IFI16 altère la production de cGAMPs lors de stimulation par l'ADN alors que la surexpression d'IFI16 amplifie la fonction cGAS. De plus, IFI16 recrute activement TBK1 vers le complexe STING stimulé par cGAMP et favorise ainsi la phosphorylation de

STING [119]. Des conclusions similaires ont été établies dans les kératinocytes suggérant qu'IFI16 est une composante importante de la signalisation STING médiée par cGAS [120].

DAI, LRRFIP1, HMGB et ABCF1 et les hélicases DDX41, DHX9 et DDX36 sont toutes décrites comme liant directement l'ADNv et régulant positivement la signalisation des IFN de type I [24, 121-123]. Certaines protéines avec des fonctions connues dans les réponses aux dommages à l'ADN ont également été signalées comme des médiateurs de la réponse antivirale déclenchée par l'ADNv. Ces protéines incluent DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) [124] et MRE11 (meiotic recombination 11 homolog) [125].

I.1.5 L'enhancéosome

La transcription rapide de l'IFN- β suite à la détection à l'infection virale représente un des exemples les mieux caractérisés de l'expression inductible de gènes chez les eucaryotes supérieurs. La cellule utilise trois facteurs de transcription pour activer l'expression du gène IFN- β : NF- κ B, IRF3 /IRF7 et ATF-2/c-Jun. Il est intéressant de noter que toutes les protéines nécessaires à la production d'IFN- β existent dans la cellule avant l'infection virale. Le NF- κ B est séquestré au cytoplasme en raison de son association avec I κ B qui est un membre de la famille des protéines inhibitrices de NF- κ B. Lors de l'infection virale, I κ B est phosphorylé puis ciblé par l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome, permettant ainsi à NF- κ B d'être transloqué au noyau [126]. L'IRF3 est également exprimé constitutivement dans les cellules. Lors de l'infection virale, il est phosphorylé à plusieurs résidus sérines, ce qui induit un changement conformationnel qui conduit à sa dimérisation puis translocation vers le noyau [127]. Contrairement à NF- κ B et IRF3, ATF-2/c-Jun est situé dans le noyau et capable de lier

l'ADN dans les cellules non stimulées. Cependant, ATF-2/c-Jun est incapable d'activer la transcription tant que son domaine d'activation n'est pas phosphorylé via la voie de signalisation MAPK [128]. En résumé, l'infection virale induit une cascade de signalisation résultant en de modifications post-traductionnelles (MPTs) requises pour l'assemblage de NF- κ B, IRF3 et ATF-2/c-Jun sur l'enhanceosome.

In vivo, ces facteurs s'attachent d'une façon coopérative sur une région du promoteur de l'IFN β dépourvue de nucléosomes, longeant une partie de -102 à -47 en amont du site d'initiation de transcription [129]. Le promoteur d'IFN- β est divisé en quatre éléments de régulation positives appelés PRDs (positive regulatory domains). PRDII et PRDIV sont respectivement reconnus et activés par les facteurs de transcription NF- κ B et l'hétérodimère ATF-2/c-Jun. PRDI et PRDIII sont reconnus et activés par les IRFs et notamment l'IRF3 et l'IRF7. La liaison des facteurs de transcription NF- κ B, IRF3 / IRF7 et ATF-2 / c-JUN en association avec la protéine

HMGA1 (High Mobility Group Protein A1) sur leurs domaines à l'ADN permet de former un complexe nucléoprotéique très ordonné appelé enhancéosome. Cette structure fournit une grande spécificité et stabilité à la transcription. L'assemblage de ce complexe permet également le recrutement séquentiel des histones acétyl transférases comme GCN5 (general-control-of-amino-acid synthesis 5) ainsi que la protéine d'attachement à CREB (CREB-binding protein (CBP)). Il en résulte l'acétylation des résidus lysine des histones H3 et H4 du nucléosome, le site du début de transcription au niveau du promoteur de l'IFN β se retrouve alors libéré, ce qui facilite le recrutement du complexe de transcription TFIID au niveau du promoteur et l'induction de la transcription de l'IFNB1 [130] (**Figure I.8**).

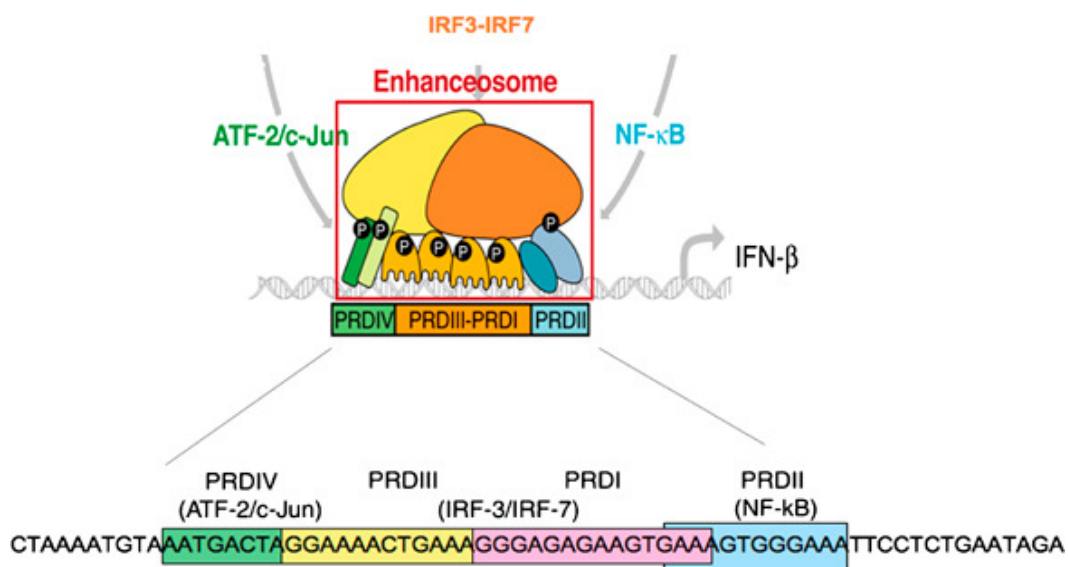


Figure I.8 : Schématisation de la structure de l'enhanceosome assemblé. Suite à l'induction virale. Les facteurs de transcription activés ; ATF-2/c-Jun, IRF3/IR7 et NF-κB vont se déplacer au noyau pour se lier respectivement aux régions PRDIV, PRDIII-I et PRDII. L'image est prise de [131].

I.1.5.1 La régulation négative des activités de l'enhancéosome

La régulation négative de la transcription des cytokines et particulièrement des IFNs de type I est d'une grande importance aussi bien dans un environnement stable que suite à une infection virale. Concernant l'IFNB1, il est bien établi que l'enhancéosome est un régulateur crucial de l'activité transcriptionnelle d'IFNB1 en absence et en présence d'une stimulation pathogène. L'enhancéosome régule également les cycles d'initiation et de terminaison de la transcription d'IFNB1 suite à l'infection virale. Cette régulation fait intervenir plusieurs mécanismes sophistiqués qui se classifient dans deux principales catégories : i- En modifiant directement l'état épigénétiques des histones sur le promoteur ii- En interférant avec l'activité des facteurs

de transcription NF- κ B et IRF3, ATF-2/c-Jun au niveau nucléaire. Dans chaque catégorie on retrouve plusieurs stratégies de régulation (**Tableau I.1**).

Nom du régulateur négatif	Mécanisme d'action	Références
Régulateurs qui se lient sur des sites définis du promoteur d'IFNB1		
PRDM1	Se lie au domaine PRDI du promoteur d'IFNB1 et inhibe la transcription en recrutant les co-répresseurs de la famille Groucho et des suppresseurs épigénétiques comme G9a et HDAC1.	[132] [133, 134]
NKRF	Se lie au site NRE du promoteur d'IFNB1 et inhibe son induction basale en interférant avec la fonction de NF- κ B	[135]
YY1	<ul style="list-style-type: none"> Se lie sur le site -90 du promoteur d'IFNB1 et recrute des deacetylases d'histones (HDAC) afin d'inhiber la transcription basale L'induction de la signalisation TLR3 entraîne la transcription NF-κB-dépendante de YY1 qui se lie sur le site PRDI/III et inhibe le recrutement d'IRF7. 	[136] [137]
ATF3	Contrôle l'activité basale et induite de l'IFNB1 en se positionnant sur un site distal du promoteur dans les macrophages.	[138]
TRIM33	Dans les phases tardives d'activation des macrophages, TRIM33 se lie sur l'élément ICE (IFNB1 Control Element) 15kb en amont du site de début de transcription d'IFNB1, réprime la transcription en empêchant le recrutement de p300/CBP.	[139]

Rb	Se lie sur le promoteur d'IFNB1 en interagissant avec c-Jun, recrute ensuite HDAC1 et HDAC8 afin d'atténuer l'acétylation H3/H4 du promoteur et inhiber son activité transcriptionnelle à la suite de l'induction virale.	[140]
Régulateurs qui interfèrent avec les fonctions de NF-κB et IRF3		
cFLIPL	Interagit avec IRF3 et empêche son interaction avec les co-activateurs p300/CBP	[141]
C6orf106	Interagit avec IRF3 et empêche son association avec le promoteur d'IFNB1 en promouvant la dégradation de p300/CBP.	[142]
AGO	Interagit avec IRF3 et interfère avec sa liaison à p300/CBP.	[143]
PIAS1	Interagit avec IRF3 et inhibe sa capacité à lier le promoteur d'IFNB1.	[144]
MafB	<ul style="list-style-type: none"> • A l'état basal, MafB se localise près des promoteurs des IFNs de type I et des gènes régulés par IRF3 et empêche une induction spontanée de la transcription. • Suite à l'induction virale, MafB interagit avec le C-terminal d'IRF3 et empêche son interaction avec p300/CBP 	[145]
Régulateurs qui entraînent la dégradation de NF-κB ou d'IRF3		
TRIM26	Suite à l'infection virale, TRIM26 se lie à l'IRF3 nucléaire et promouvoit sa polyubiquitination k48 puis sa dégradation, ce qui atténue la transcription d'IFNB1.	[146]
PDLIM2	Promouvoit la polyubiquitination de p65 au niveau nucléaire et permet son déplacement vers des domaines	[147]

	subnucléaire distincts appelés ‘PML nuclear bodies’ où il est dégradé par le protéasome.	
HSP70	S’associe à PDLIM2 et à la protéine associée au protéasome BAG-1 (athanogène 1 associé au BCL2) et promouvoit le transport du complexe NF-κB-PDLIM2 vers le protéasome, facilitant ainsi la dégradation de p65.	[148]
MKRN2	Se lie à p65 nucléaire et promouvoit sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Notamment, MKRN2 et PDLIM2 favorisent de manière synergique la polyubiquitination et la dégradation de p65.	[149]

Tableau I.1: Régulateurs négatifs de l’enhancéosome.

I.1.5.1.1 Des protéines qui s’associent sur des sites définis du promoteur d’IFNB1:

Dans ce sens, PRDI-BF1 (aussi appelé PRDM1 ou BLIMP1) a été identifié comme un répresseur transcriptionnel qui s’associe avec le domaine PRD-I de l’enhancéosome et bloque son activation suite à l’infection virale [132]. Les travaux subséquents ont révélé que PRDI-BF1 exerce ces fonctions répressives à travers le recrutement d’enzymes modificatrices d’histones comme HDAC2, G9a, PRMT5 et LSD1 et des co-represseurs de la famille Groucho [133, 134]. Plus récemment, PRDI-BF1 est proposé comme un marqueur potentiel permettant d’identifier des patients ayant plus d’habilité à réussir les thérapies par des virus oncolytiques. En effet, l’expression induite par VEGF de PRDI-BF1 a été impliquée dans la répression de l’immunité innée dans la vasculature tumorale. Il en résulte que les cellules endothéliales vasculaires tumorales sont plus sensibles à l’infection par des virus oncolytiques rendant ainsi le traitement plus efficace [150].

NRE (Negative Regulatory Element) est un site de régulation négative se chevauchant avec le domaine PRDII qui fonctionne comme un répresseur de l'activité basale du promoteur IFNB1 en interférant avec l'activité de NF- κ B [151]. Les travaux subséquents ont identifié NKRF (NF- κ B repressing factor) comme la protéine clé qui se lie sur le NRE afin d'entraver la fonction de NF- κ B [135]. Toutefois le mécanisme d'action de NKRF n'a pas été élucidé.

YY1 est un facteur de transcription qui dépendamment du type cellulaire et du contexte du promoteur peut fonctionner comme un activateur ou un répresseur transcriptionnel [152-154]. Au niveau du promoteur d'IFNB1, l'association de YY1 sur les deux sites -90 et -122 mène au recrutement de CBP engendrant l'activation de la transcription [155]. À l'inverse, son action répressive est associée avec sa liaison sur le site -90 et le recrutement des déacétylases d'histones (HDAC) afin de réprimer le promoteur d'IFNB1 [136]. Ainsi, la transition de YY1 entre répresseur et activateur est dictée par l'occupation d'un seul site (-90 avant l'infection virale) ou des deux sites (-90 et -122 après l'infection virale). Par la suite, un autre modèle d'induction de la fonction répressive de YY1 a été proposé suite à l'activation de la voie IFNB1 par le poly(I:C). Les auteurs de cette étude montrent que l'activation de la voie TLR3 dans la phase tardive induit l'expression de YY1 via un mécanisme dépendant de NF- κ B. Ensuite, YY1 cible sélectivement la région PRDI/III de l'enhanceosome et inhibe la liaison du facteur de transcription IRF7 et ainsi limite la prolongation de l'expression d'IFNB1 [137].

Au niveau des macrophages, ATF3 agit aussi comme un répresseur transcriptionnel qui régule l'expression d'IFNB1 basale et suite à l'infection virale via l'association à un site de régulation distal du promoteur d'IFNB1. De plus, ATF3 est de même un ISG qui module l'expression de

plusieurs gènes en aval de la signalisation d'IFN suggérant son action en boucle de rétrocontrôle négatif [138]. Toujours dans les macrophages, TRIM33 est recruté au niveau d'une région distale de 15kb en amont du site de début de transcription d'IFNB1 durant les phases tardives d'activation des macrophages. Il en résulte la prévention du recrutement des co-activateurs CBP-p300 et donc la terminaison de l'activation de la transcription [139]. Rb (retinoblastoma protein) est démontré comme liant sélectivement le promoteur d'IFNB1 en interagissant directement avec c-JUN. Rb recrute par la suite HDAC1 et HDAC8 afin d'atténuer l'acétylation des histones H3/H4 sur le promoteur d'IFNB1 résultant en la suppression de son activité transcriptionnelle [140].

I.1.5.1.2 Des protéines qui interfèrent avec les facteurs de transcription NF- κ B et IRF-3

cFLIPL, C6orf106, AGO (Argonaute 2), PIAS1, MafB sont tous des régulateurs négatifs qui interagissent avec IRF3, interfèrent avec son co-activateur p300/CBP et empêchent ainsi la formation de l'enhancéosome [143] [141] [144] [142, 145].

Une autre stratégie de terminaison de la transcription active d'IFNB1 consiste en la dégradation nucléaire d'IRF3 ou de p65. Dans ce sens, TRIM26 favorise spécifiquement l'ubiquitination et la dégradation d'IRF3 nucléaire ce qui atténue l'activation du promoteur d'IFNB1 [146]. De même, PDLIM2 est une E3 ligase qui polyubiquitine p65 au niveau du noyau favorisant ainsi sa dégradation [147]. Par la suite, HSP70 est identifié comme régulateur négatif de la réponse inflammatoire médiée par NF- κ B en permettant le transport du complexe PDLIM2-p65 vers le protéasome [148]. Plus récemment, un criblage double hybride chez la levure a ciblé l'identification des partenaires de PDLIM2 dans la régulation négative de p65. Ainsi, MKRN2

est identifié comme un interactant de PDLIM2 coopérant avec lui dans la polyubiquitination et dégradation de p65, régulant ainsi négativement les réponses inflammatoires [149].

Par ailleurs, c'est intéressant de noter que la régulation de l'immunité innée à travers les longs ARNs non-codant (lncRNA) est un domaine d'étude émergent qui suscite actuellement beaucoup d'intérêt. En effet, les études fonctionnelles ont démontré la participation des lncRNAs dans la régulation d'une multitude de processus physiologiques dont le système immunitaire [156]. Plusieurs des lncRNA étudiés ont démontré leur capacité à réguler les processus immunologiques qui affectent directement la réponse IFN. Par exemple, le lncRNA PACER, LETHE, NKILA et THRIL régulent la réponse inflammatoire à travers la liaison avec les sous-unités NF- κ B aux promoteurs des gènes de TNF α [157-160]. Ainsi, en plus de leur rôle dans la réponse inflammatoire, ces lncRNAs affectent directement l'amplitude de l'expression des IFNs à travers la régulation des fonctions de NF- κ B. Toutefois, les connaissances actuelles sur l'identité et la fonction des lncRNA dans les cellules infectées par des virus sont limitées et suscitent plus d'investigation.

I.1.6 Les interférons : l'arme singulière du système immunitaire

Le mot interféron veut dire empêcher et s'opposer à. Cette nomenclature tire son origine d'une observation qui date de 1935, où on avait constaté que l'infection expérimentale d'un animal par un virus interfère et empêche son infection par un autre virus inoculé 48 heures plus tard.

En 1957, Isaacs et Lindenmann ont repris ces travaux afin de décrire l'interférence. Ils ont infecté une culture de membrane chorio-allantoïdienne (MCA) par un virus de grippe inactivé par la chaleur, par la suite ils ont rajouté le surnageant de ces cellules sur une culture fraîche de

MCA et 24 heures plus tard ils ont rajouté une suspension de virus de la grippe vivant et ont fait la constatation que le virus ne se multiplie pas. C'est ainsi qu'ils ont découvert la première cytokine, sécrétée par les cellules infectées par le virus inactivé et utilisée par les cellules saines. Les chercheurs l'appellent alors interféron (IFN) [161].

Plusieurs interférons ont été par la suite découverts. Ce sont tous de petites protéines d'environ 150 acides aminés et qui sont subdivisés en trois grandes familles : I, II et III selon l'origine cellulaire de leur sécrétion et leurs propriétés biologiques.

La fixation des trois classes d'IFNs sur leurs récepteurs entraîne des événements communs mais pas identiques (**Figure I.9**). Ces événements se résument dans l'activation des kinases JAK1 et TYK2 qui mènent par la suite à l'activation des facteurs de transcription STAT1 à STAT5 [162-165]. Les STATs activés induisent ensuite la transcription des ISGs qui permettent l'installation de l'état antiviral [166].

Des quantités élevées des IFNs sont induites dans la phase précoce de l'infection. Les rôles positifs des IFNs dans cette première phase de la réponse sont actuellement bien établis. Ils favorisent la clairance virale par différents mécanismes, notamment les effets antiviraux directs, l'activation des cellules dendritiques, des cellules NK et l'amélioration des réponses des cellules B et T [167]. La production des IFNs est rapidement interrompue après des infections aiguës entraînant une clairance virale. Toutefois, l'inflammation persistante et l'activation immunitaire subséquente sont associées à une aggravation de la progression de la maladie dans les infections chroniques et, bien que de nombreux facteurs d'inflammation existent, la signalisation prolongée des IFNs est révélée comme un mécanisme principal [168]. Ceci suggère qu'en plus de favoriser

l'immunité antivirale, l'inflammation chronique médiée par les IFNs peut entraîner un dysfonctionnement immunitaire progressif qui peut mener à des maladies distinctes de la réplication du virus [169].

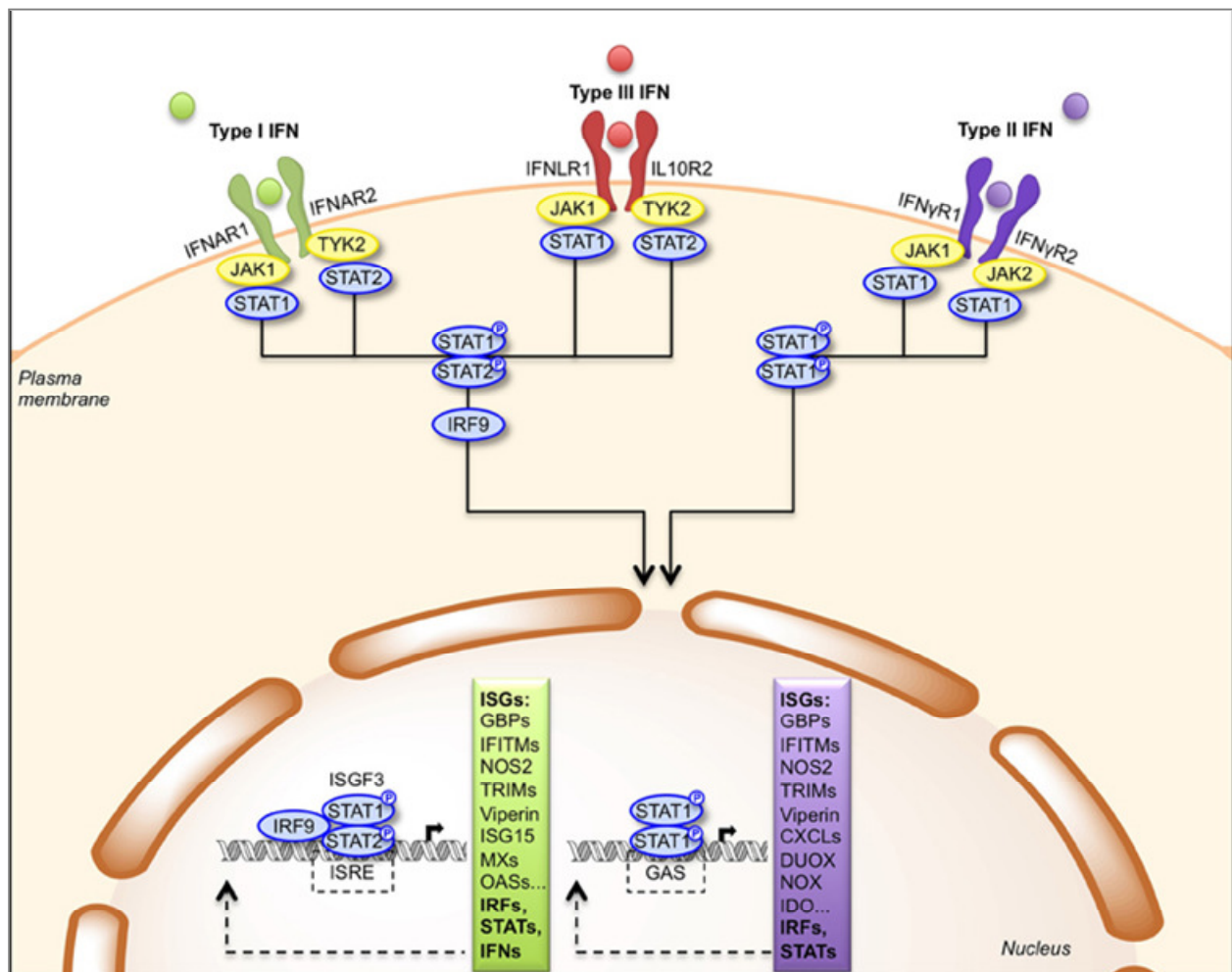


Figure I.9: Formation des complexes ligands/récepteurs et signalisation des interférons de type I, II et III. L'interaction des interférons de type I et III avec leurs récepteurs respectifs IFNAR1 et IFNAR2 et IL10R2 et IFNRL1 induit la phosphorylation des kinases JAK1/JAK2 qui activent STAT1 et STAT2. L'hétérodimère phosphorylé STAT1/STAT2 se lie à IRF9 formant ainsi le complexe ISGF3, qui une fois dans le noyau induit l'expression des gènes ayant la

séquence ISRE dans leurs promoteurs. L'interaction de l'IFN de type II avec le récepteur IFN γ R1/IFN γ R2 induit la phosphorylation de JAK1/JAK2 qui active STAT1. L'homodimère STAT1 phosphorylé est transloqué dans le noyau où il induit l'expression des gènes dépendant de la séquence GAS (γ -activated sequence). L'image est prise de [170].

I.1.6.1 Les interférons de type I

Les IFNs de type I sont transcrits à partir de gènes variés et sont composés d'IFN- α et β qui sont les mieux décrits et d'autres produits moins définis incluant IFN ϵ , IFN τ , IFN κ , IFN ω , IFN δ et IFN ζ [171]. Les IFN α sont codés par de nombreux gènes dont on recense 13 chez l'humain, tandis qu'un seul gène code pour l'IFN- β [172]. Tous ces gènes sont situés sur le bras court du chromosome 9. Pratiquement, toutes les cellules sont capables de synthétiser l'IFN- α et β incluant les leucocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales. Ces IFNs activent la même voie de signalisation menant à l'activation du complexe ISGF3, réunissant les facteurs STAT1, STAT2 et IRF9[173].

I.1.6.2 L'interféron de type II

L'IFN γ est le seul composant de cette catégorie. Sa production est largement limitée aux cellules du système immunitaire et particulièrement les cellules T et NK. Cependant, les protéines IFN γ R1/2 sont largement exprimées, et par conséquent presque tous les types cellulaires sont capables de répondre à IFN γ [174]. La signalisation qui en résulte joue un rôle majeur dans l'instauration de l'immunité cellulaire, et elle induit également l'expression de gènes qui amorcent la réponse IFN de type I. De même, la signalisation IFN de type I amorce également la signalisation IFN- γ [4]. Dans l'ensemble, l'IFN- γ joue un rôle essentiel dans la régulation de la fonction immunitaire et dans le rapprochement des réponses innées et adaptatives [175, 176]

I.1.6.3 Les interférons de type III

Cette famille est composée de l'IFN λ 1, IFN λ 2 and IFN λ 3, aussi connus sous les noms IL-29, IL-28A et IL-28B, respectivement [163, 177], et de la cytokine IFN λ 4 récemment identifiée [178]. Tous les IFNs de type III se lient au même complexe de récepteur IFN- λ qui comprend la chaîne 1 spécifique du récepteur IFN- λ (IFN- λ R1(IL28RA)) et la chaîne 2 du récepteur IL-10 (IL-10R2 (IL-10R β)). Contrairement au récepteur des IFNs de type I qui est exprimé d'une façon ubiquitaire, IFN- λ R1 affiche une distribution cellulaire restreinte [179]. Dans les cellules non-hématopoïétiques, son expression est limitée aux cellules épithéliales incluant les hépatocytes. Par conséquent, seulement les cellules épithéliales peuvent répondre aux IFNs de type III suggérant que ces cytokines doivent avoir des fonctions immunitaires spécialisées pour une protection antivirale sans inciter une réponse pro-inflammatoire systémique [180].

Les IFN de type III étaient à l'origine identifiés comme un nouveau système antiviral agissant parallèlement aux IFN de type I, mais les études ultérieures ont fourni plusieurs preuves que les deux familles d'IFNs ont des rôles distincts tout en ayant plusieurs niveaux de régulation croisée[181]. Par exemple, les infections des muqueuses semblent induire principalement l'expression d'IFN- λ . Ainsi, les cellules épithéliales représentent la source primaire de production d'IFN- λ dans le tractus gastro-intestinal de souris infectées par le réovirus et rotavirus. Les IFN- α s sont produits plus tard et nécessitent la présence de cellules immunitaires, telles que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC), qui produisent à la fois les IFN- α s et IFN- λ s. Dans l'ensemble, les modèles d'expression et les niveaux de production des IFN de type I et de type III varient en fonction du site de l'infection et de la spécificité du pathogène viral.

I.1.7 La signalisation des IFNs de type I

Suite à leur production, les IFNs de type I induisent une signalisation qui aboutit à la transcription d'une large gamme de gènes de façon autocrine et paracrine. Dans la signalisation canonique, l'IFN- β et les sous types d'IFN α se lient et amorcent la cascade à travers un récepteur hétérodimérique transmembranaire appelé IFNAR1 et IFNAR2 [173]. Avant leur activation par les IFNs, la partie ou séquence protéique intracytoplasmique d'IFNAR1 est associée à la protéine TYK2 tandis que la sous-unité IFNAR2 est associée à JAK1. La molécule STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription 2) est aussi attachée à IFNAR2 et s'associe faiblement avec IFNAR1. La liaison des IFNs induit la dimérisation du récepteur causant ainsi un changement conformationnel qui permet l'activation de TYK2 et JAK1. Ainsi, les deux kinases activées phosphorylent les activateurs transcriptionnels STAT1 et STAT2 qui forment un hétérodimère stable [173]. Une fois transloqué dans le noyau, le complexe STAT1-STAT2 s'associe avec IRF9 et forment le complexe ISGF3. Ce complexe s'attachera par la suite sur les régions ISRE (IFN-Stimulated Response Element) retrouvées au niveau des promoteurs de la plupart des gènes inductibles par les IFNs de type I (ISGs). Une découverte récente a révélé que la phosphorylation et l'activation de STAT1 dans la signalisation des IFNs de type I nécessitent la méthylation de STAT1 sur le résidu K525 par la méthyltransférase SETD2 (Set Domain containing protein 2). SETD2 catalyse également la marque H3K36me3 sur le promoteur de certains ISGs[182]. En plus de former le complexe ISGF3, les IFNs de type I peuvent également induire STAT1 à former un homodimère qui ne s'assemble pas avec IRF9. Cet homodimère se lie alors à une séquence consensus distincte TTCNNGAA nommée GAS (Gamma-Activated

Sequence) sur les promoteurs des ISGs[183]. Outre les homodimères STAT1/1 et STAT2/2, les IFNs de type I peuvent également activer STAT3/3, 4/4, 5/5, 6/6, 1/3, 1/4, 1/5, 2/3, et 5/6, qui peuvent tous se lier au GAS et induire une expression génique dépendante du GAS [184]. De plus, il y a plusieurs évidences qui indiquent que les STATs non-phosphorylés appelés U-STAT1 et U-STAT2 peuvent former avec IRF9 le complexe U-ISGF3 qui peut être transloqué dans le noyau et induire l'expression d'un groupe distincts d'ISGs afin de prolonger l'état antiviral [185]. Il existe également une voie de signalisation des IFNs α/β qui est indépendante de STAT1, où le complexe STAT2/IRF9 peut potentiellement remplacer le rôle d'ISGF3 permettant ainsi une transcription prolongée des ISGs et offrant une réponse de secours contre l'infection virale [186].

D'autre part, les IFNs de type I peuvent activer des voies de signalisation dites non-canoniques car elles ne dépendent pas de JAK-STAT. Les MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases), y compris p38 et ERKs (Extracellular signal Regulated Kinases) jouent un rôle critique dans cette expression des ISGs [183]. Ainsi, l'inhibition de l'activité p38 a bloqué l'activation transcriptionnelle induite par l'IFN α via des éléments ISRE, sans toutefois affecter la phosphorylation de STAT1 et STAT2, ni la formation des complexes ISGF3 et GAS [187]. L'activation de p38 par les IFNs a été démontrée comme requise pour induire les effets anti-prolifératifs des IFNs de type I sur les cellules leucémiques. Quant à la réponse antivirale, il a été prouvé que l'inhibition pharmacologique de p38, ou la surexpression d'un dominant négatif réduisent les propriétés antivirales de l'IFN α contre le virus de la stomatite vésiculeuse et le virus de l'encéphalomyocardite [188] [189]. De même, p38 intervient dans la réponse anti-virale de

l'IFN α contre le VHC [190]. D'autres voies de MAPK impliquent également une signalisation en aval de l'IFN α/β , telle que la voie MEK-ERK[191]. D'ailleurs l'infection par le virus du myxome induit une signalisation ERK1/2 pour activer la signalisation des IFNs de type I [192]. La signalisation mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) est également activée par les IFNs de type I et II. Il en résulte l'inactivation suivie de la dissociation du répresseur 4E-BP-1 du facteur d'initiation de la traduction eIF4E afin de réguler positivement la traduction induite par les IFNs des ARNm [193].

I.1.7.1 Les ISGs : une brève description

Les IFN de type I induisent l'expression de plus de 300 ISGs dont les produits ne sont pas létaux pour la cellule hôte, mais peuvent nuire à la réplication virale [194]. La principale action des ISGs est l'inhibition des différentes étapes du cycle de vie viral, telles que l'entrée, la transcription, la traduction, la réplication du génome, l'assemblage et la sortie du virus, permettant ainsi au système IFN d'orchestrer une attaque intégrale contre la réplication virale. Cette stratégie explique probablement l'incapacité d'un virus sensible à l'IFN de muter rapidement en un virus résistant [195]. Les ISGs augmentent également la sensibilité de détection du pathogène viral. Les PRRs comme RIG-I, OAS, cGAS, TLR3,7,9 les IRFs et autres régulateurs de leur signalisation sont présents dans la cellule à l'état basal, mais leur expression est augmentée par les IFNs de type I. Ainsi, ce groupe d'ISGs renforce la transcription d'IFN et préparent les cellules à mieux détecter l'agent pathogène [4] (**Figure I.10**).

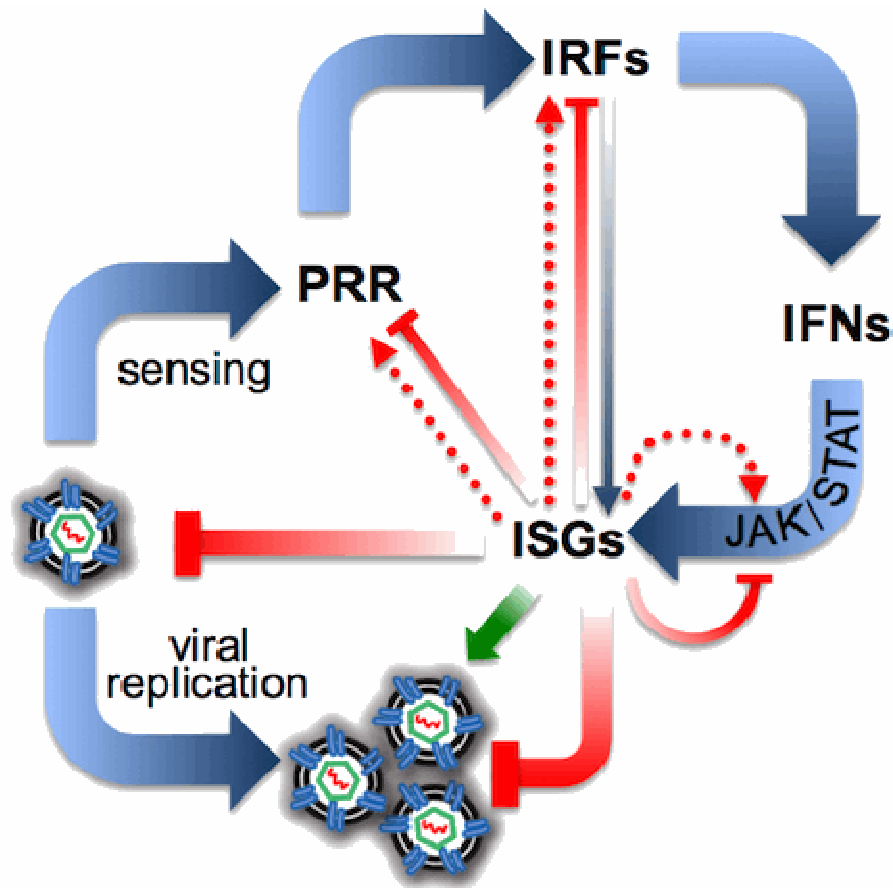


Figure I.10 : Les différents rôles des ISGs dans la réponse antivirale. Les virus sont détectés par les PRRs, conduisant à l'activation des IRFs et à l'induction transcriptionnelle des IFNs. Ces derniers signalent à travers la voie JAK/STAT pour induire la production des ISGs. Les ISGs peuvent également être directement induits par certains IRFs dans une voie indépendante de l'IFN (flèche bleue fine). Certains ISGs fonctionnent en bloquant la réplication virale (barres rouges épaisses), tandis que d'autres ont la capacité de promouvoir ou d'améliorer la réplication de certains virus (flèche verte). Un sous-ensemble des ISGs sont eux-mêmes des composants de la voie IFN ou favorisent sa signalisation (flèches en pointillés rouges). L'IFN induit également plusieurs régulateurs négatifs capables de cibler les PRRs, les IRFs ou JAK/STAT pour atténuer la réponse. L'image est prise de [196].

Il est intéressant de noter que plusieurs ISGs peuvent être induits indépendamment des IFNs. En effet, tout stimulus capable d'activer un membre de la famille des IRFs, a le potentiel d'induire des ISGs. À cette fin, les récepteurs TLRs ou les RLRs utilisent IRF-3 ou IRF-7 pour induire des ISGs [197]. Cette signalisation alternative permet de contrecarrer les stratégies d'évasion virale qui ciblent la voie JAK-STAT [4]. Par conséquent, les ISGs induits dans les cellules infectées résultent souvent de l'activation des IRFs et non de l'action des IFNs. Étant donné que les ISG peuvent être induits par une variété de réponses cellulaires au stress, leurs fonctions biologiques sont probablement étendues et ne se limitent pas nécessairement aux effets antiviraux.

I.1.7.1.1 Les IFITs (IFN-Induced protein with Tetratricopeptide repeats)

Ils représentent une composante majeure de la protection antivirale de l'hôte, il y a quatre membres chez l'humain ; ISG56/IFIT1, ISG54/IFIT2, ISG60/IFIT3, et ISG58/IFIT5 [194].

Suite à l'infection virale, les IFITs sont d'abord induits via les IRFs activés et par la suite, la voie JAK-STAT renforce leur transcription [198, 199]. Notamment, L'ISRE des IFIT1/2 est préférentiellement reconnu par IRF3 [200], d'où leur utilisation comme marqueur de l'activation d'IRF3 et de transcription de gènes anti-viraux. IFIT 1/2 inhibent la traduction d'ARNm en se liant au facteur d'initiation de la traduction eIF3, cela peut ralentir la réplication du virus en ralentissant le métabolisme cellulaire global. En outre, IFIT1 inhibe *in vitro* la traduction CAP-indépendante menée par le IRES (Internal Ribosome Entry Site) du VHC, cette structure secondaire complexe d'ARN nécessitant également eIF3 pour le recrutement des ribosomes [201]. Similairement au RLRs qui reconnaissent les marques particulières de l'ARN viral, IFIT1

peut se lier spécifiquement aux extrémités 5' des ARNs dont les coiffes sont dépourvues de 2'-O-méthylation du premier ribose, caractéristique de certains ARNm viraux mais non cellulaires. En conséquence, IFIT1 rentre en compétition avec eIF4E pour la liaison du cap et empêche la traduction de l'ARNm (viral) [194]. De plus, plusieurs évidences actuelles suggèrent un rôle important des IFITs dans la régulation de l'immunité innée. Par exemple, IFIT1 mène un rétrocontrôle négatif sur la production d'IFN- β en perturbant l'interaction entre MAVS ou STING et TBK1 et, par conséquent, atténue l'activation d'IRF3 pour empêcher la sur-activation de la réponse antivirale [202].

I.1.7.1.2 La protéine PKR

La kinase PKR fait partie des ISGs les plus étudiées pour sa capacité à lier l'ARNdb. Cette protéine a plusieurs propriétés antivirales. Elle inhibe la traduction des protéines virales et cellulaires via la phosphorylation de eIF2 α (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 α), induit l'autophagie et active les protéines de l'inflammasome [203].

Lorsque les cellules non-infectées sont amorcées avec les IFNs, l'expression de PKR est augmentée mais la protéine reste inactive. Suite à l'infection, les PAMPs viraux tels que l'ARNdb sont reconnus par PKR puis entraînent sa dimérisation puis son activation par autophosphorylation [204]. La PKR activée phosphoryle alors le facteur eIF2 α entraînant une inhibition générale de l'initiation de la traduction, stoppant ainsi la propagation du virus. Ainsi, son activité étant limitée, les cellules non infectées sont protégées de tout effet néfaste de PKR [204]. D'autres études montrent que PKR collabore aussi avec les RLRs afin d'induire la réponse aux IFNs au niveau des granules de stress. En effet, l'infection virale induit des réponses

de stress cellulaire, y compris la formation de granules cytoplasmiques appelés granules de stress (GS). La formation des GSs dépend majoritairement de la phosphorylation de eIF2 α au niveau du résidu Ser51 par PKR [205, 206]. Ainsi, l'infection virale induit la co-localisation au niveau des GSs des RLRs, de PKR et d'autres protéines antivirales avec l'ARNv et les protéines virales, ce qui supportent la théorie que les GSs fonctionnent comme une plateforme pour la signalisation antivirale [207].

I.1.7.1.3 Autres exemples d'ISGs

Il y a des ISGs qui interfèrent avec l'entrée virale comme Mx1 (murine myxovirus resistance 1), les modèles actuels suggèrent que Mx1 reconnaît les composants viraux tels que les nucléocapsides et, grâce à son activité GTPase, induit des changements conformationnels qui mènent à la séquestration et désintégration de la structure virale ciblée [208]. Plusieurs membres des protéines TRIMs ont aussi des fonctions antivirales, par exemple TRIM5 α qui est la mieux caractérisée pour sa capacité à lier directement la capsid virale entraînant son désassemblage accéléré [209].

Il y a aussi des ISGs qui régulent négativement la signalisation d'IFN afin de retourner à l'état basal. Dans ce groupe, on retrouve les protéines SOCS qui inhibent la signalisation JAK-STAT en se liant aux résidus tyrosines phosphorylés des récepteurs d'IFN ou des protéines JAK [4]. USP18 est aussi une protéine bien décrite pour son rôle important dans le maintien à long terme de la désensibilisation de la signalisation d'IFN de type I via son interaction avec le récepteur IFNAR2 [210].

I.1.8 Les subversions des virus à la réponse anti-virale innée

L'activation des RLRs est scrupuleusement régulée par de multiples mécanismes. Toutefois, au cours de leur co-existence avec l'hôte, les virus ont développé plusieurs mécanismes de subversion afin d'inhiber ou de contourner cette réponse antivirale. Les stratégies virales utilisées incluent la dissimulation des acides nucléiques viraux ou l'interférence avec les RLRs ou les modulateurs de la signalisation afin d'induire leur relocalisation ou dégradation. Ces interactions virus-hôte ont aiguisé notre compréhension de la pathogénèse virale et ont fourni des données importantes sur le fonctionnement des voies des PRRs. En élargissant nos connaissances sur les interactions virus-hôte responsables de l'induction et de l'inhibition des réponses IFN, nous pourrions trouver des moyens rationnels de faire pencher cette réponse pour un meilleur avantage pour l'hôte, ce qui pourrait mener à la conception de nouveaux antiviraux et vaccins [211].

I.1.8.1 Dissimulation ou modification de l'ARN viral

La plupart des virus à ARN se répliquent dans le cytoplasme où les RLRs sont également présents et bien positionnés pour détecter l'ARN étranger. Plusieurs virus ont développé des moyens de séquestrer leur génome pour échapper à la surveillance par les RLRs. Une stratégie majeure utilisée par les virus pour empêcher les RLRs d'accéder à l'ARN viral est d'induire la formation de compartiments de réplication spécifiques confinés dans des membranes cellulaires, ou de se répliquer sur des organelles tels que le RE, l'appareil de Golgi et les mitochondries [66]. Par exemple, le DV, un flavivirus transmis par les moustiques qui cause une fièvre hémorragique sévère, se réplique dans des membranes convoitées du RE, ce qui dissimule efficacement

l'ARNdb du cytosol, empêchant ainsi l'activation des RLRs [212]. Contrairement aux membres de la famille des *Flaviviridae* et à la plupart des autres virus à ARN, l'IAV se réplique dans le noyau pour éviter la détection de l'ARN viral par les RLRs dans le cytoplasme. En fait, l'IAV contient huit segments de génome d'ARN qui stimulent puissamment l'activation de RIG-I si elle est trouvée en grandes quantités dans le cytoplasme. En outre, IAV a développé une stratégie pour éviter la reconnaissance de l'ARN viral pendant le court transit du virus à travers le cytoplasme suite à son entrée. En effet, il a été montré que, dans certaines souches de l'IAV, la sous-unité PB2 de la polymérase virale ayant la mutation adaptative K627 affaiblit la détection par RIG-I, des ARNs génomiques entrants déjà encapsidés dans des nucléoprotéines et associés avec l'ARN polymérase [213]. De même, d'autres virus utilisent des protéines de l'hôte ou des protéines virales qui protègent l'ARN viral des RLRs. Par exemple, la protéine virale 35 (VP35) provenant du virus EBOV et Marburg, la protéine non structurale 1 (NS1) de l'IAV et la protéine E3 du virus vaccinia se lient à l'ARNdb viral pour éviter la détection par RIG-I [214-218], alors que le RSV (respiratory syncytial virus), appartenant à la famille *Paramyxoviridae* et qui peut causer une infection sévère des voies respiratoires surtout chez les enfants, utilise la protéine de l'hôte RBP (RNA binding protein) 'La' pour empêcher RIG-I de se lier à l'ARN viral [219].

I.1.8.2 Modulation des RLRs par des MPTs:

Comme l'ubiquitination représente un mécanisme de régulation critique à l'activité de RIG-I, il n'est pas surprenant qu'elle soit une cible attrayante pour la manipulation virale. Les virus ont développé des moyens d'inhiber l'ubiquitination K63 de RIG-I en interagissant avec les E3 ligases TRIM25 et Riplet. Par exemple, il a été démontré que la protéine NS1 provenant de

diverses souches d'IAV interagissent directement avec TRIM25, inhibant ainsi son homo-oligomérisation qui est cruciale pour son activité enzymatique d'attacher les chaînes de poly-ubiquitin K63 au niveau des domaines CARDs de RIG-I [220].

D'une façon similaire, la protéase NS3-4A du VHC clive Riplet afin de prévenir l'ubiquitination K63 de RIG-I [221].

En outre, les virus peuvent inhiber l'ubiquitination K63 de RIG-I indépendamment des interactions protéine-protéine, en modulant par exemple l'abondance de microARN cellulaires. Par exemple, la protéine 3C de l'entérovirus 71 (EV71), un membre de la famille *Picornaviridae* qui provoque des maladies de la main, de la fièvre aphteuse et occasionnellement des maladies graves du système nerveux central, diminue la microARN hôte miR-526a afin d'augmenter l'expression de la cellule DUB enzyme CYLD, inhibant ainsi l'activation de RIG-I [222].

I.1.8.3 Dégradation, clivage ou interférence avec les plateformes de signalisation

L'un des moyens les plus efficaces pour inhiber la signalisation des RLRs est d'éliminer le détecteur ou l'adaptateur clé de sa voie de signalisation. Ainsi, de nombreux virus encodent des protéases virales qui clivent directement RIG-I et MDA-5. À titre d'exemple, la protéase 3C^{pro} du poliovirus et du EV71 (EnteroVirus71) clivent RIG-I, tandis que la protéase 2A^{pro} du EV71 clive MDA-5 [223, 224]. Comme MAVS est cruciale à la fois pour la signalisation de RIG-I et MDA5, il n'est pas surprenant que de nombreuses protéases virales la ciblent, comme 3C^{pro} du virus de l'hépatite A, 2A^{pro} de EV71 et NS3-NS4A du VHC [224-226]. D'autre part, la protéine NS4B du DV induit des changements morphologiques au niveau des mitochondries qui empêchent leur habilité à servir comme plateforme de signalisation pour MAVS [227]. De

même, un récent rapport a démontré que la protéine M du HPIV3 (human parainfluenza virus type 3), induit la mitophagie ciblant les mitochondries vers les autophagosomes, bloquant ainsi la génération de la plateforme de signalisation de MAVS au niveau des mitochondries [228].

I.1.8.4 Modulation des composants de la voie de signalisation

Les protéines non structurales de NS2A et NS4B de DV ainsi que la protéine FLIPs du MCV (Molluscum Contagiosum Virus) réduisent la phosphorylation de TBK1 prévenant ainsi son activation [229, 230]. D'autres virus empêchent la formation de complexes fonctionnels contenant TBK1. Comme la protéine K7 du vaccinia virus qui prévient la formation du complexe TBK1/IKK ϵ qui induit l'activation d'IRF3 en ciblant la protéine DDX3 (DEAD box protein 3) [231]. Deux autres virus HTNV (Hantaan virus) et SARS-CoV détruisent les complexes TBK1–TRAF3 et TANK–TBK1/IKK ϵ respectivement [232, 233].

La régulation virale des facteurs de transcription IRF et NF- κ B, sert aussi de points de manipulation de la signalisation des RLRs. L'un des exemples les mieux étudiés est l'inhibition de l'activité IRF3 par la protéine NS1 de l'IAV [234]. En outre, le HSV-1, le virus de la rage, le SARS-CoV, ainsi que plusieurs paramyxovirus interfèrent avec l'état de phosphorylation d'IRF3, bloquant ainsi l'induction d'IFN [235-238]. Le VEB (Virus Epstein-Barr) conjugue SUMO à IRF7 au niveau de K452 pour diminuer son activité transcriptionnelle [239]. La protéine NS1 du rotavirus cible IRF3 et IRF7 pour la dégradation en les empêchant de subir la dimérisation [240].

Les virus ont également développé divers moyens pour supprimer la capacité de liaison d'ADN d'IRF3. Le virus de l'herpès simplex, le virus thogoto et le KSHV (Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus) ont tous développé des stratégies pour réguler négativement l'activité

transcriptionnelle d'IRF3 en perturbant la formation des complexes transcriptionnels se liant à IRF3 ou en rentrant en compétition avec IRF3 sur son site de liaison sur le promoteur d'IFNB1 [241-243].

Les stratégies virales ciblant l'inhibition des activités cytoplasmiques ou transcriptionnelles de NF- κ B ont été étudiées de manière approfondie au cours de l'infection par le virus vaccinia qui utilise les protéines K1 et C4 pour empêcher l'activation de NF- κ B [244, 245]. HSV-1 supprime l'activation NF- κ B via les protéines VP16 et US3 [246, 247].

I.2 Introduction (Partie B): les WNTs et la CTNNB1

I.2.1 Présentation

La découverte du premier gène WNT remonte à l'année 1982 lorsque des chercheurs ont constaté que des souris infectées avec le virus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) développent des tumeurs caractérisées par l'activation du gène *Int1* d'où l'appellation initiale du gène WNT par *Int1* [248]. Par la suite, en 1987, des chercheurs ont réalisé que le gène *Int1* est l'homologue du gène *Wg* chez la drosophile qui est impliqué dans la régulation de la morphogenèse [249]. Ainsi, le nom WNT dérive de la combinaison des noms des deux gènes homologues (*Wg+Int1*).

I.2.2 Les ligands WNTs

La découverte de nombreux ligands WNTs a eu un grand impact sur tous les aspects de la biologie de développement. Sur le plan cellulaire, les ligands WNTs régulent une panoplie de processus physiologiques incluant le fonctionnement des cellules souches, la prolifération, la

différenciation, la survie, l'apoptose et la motilité cellulaire [250]. Le caractère multifonctionnel des ligands WNTs a suscité d'intenses recherches qui ont conduit à la découverte de 19 gènes humains codant pour différents WNTs [251].

La signalisation WNT fait partie des rares voies qui sont impliquées dans les processus de développement comme les voies Notch-Delta, Hedgehog, TGF- β /BMP et Hippo. La particularité des WNTs par rapport aux autres facteurs de croissance réside dans leur capacité à donner la forme aux tissus en croissance tout en induisant la prolifération des cellules. Ainsi, les WNTs agissent dans le processus de développement en tant que facteurs de croissance directionnels [252]

I.2.2.1 Spécificité de la signalisation WNT

Les ligands WNTs s'associent avec les récepteurs FZDs (Frizzled), il en existe dix chez l'homme mais le lien entre les 19 ligands WNTs et les 10 récepteurs est loin d'être parfaitement élucidé. D'où la question sur la spécificité de cette signalisation: les WNTs individuels ont-ils des fonctions uniques ou qui se chevauchent ? Les arguments en faveur des rôles uniques des WNTs proviennent des données génétiques de perte de fonction; la plupart des gènes Wnts, une fois éliminés, ont des phénotypes distincts [252]. Par exemple, les souris mutantes pour Wnt1 présentent un défaut du cerveau moyen [253], tandis que les mutants Wnt4 sont compromis dans le développement du rein [254]. De plus, les WNTs bénéficient d'un grand niveau de conservation de telle sorte que les êtres primitifs comme Hydra et Cnidaria ont un ensemble de gènes Wnts qui correspondent un par un à leur homologue chez les vertébrés [255]. Ces données

soulignent que les propriétés intrinsèques des différents WNTs sont importantes pour leurs fonctions [252].

En revanche, quant aux mécanismes de signalisation biochimique ou les effets sur les cellules cibles, les différents WNTs se comportent de manière très similaire. En ce qui concerne leur liaison aux récepteurs FZDs, il existe une réactivité croisée importante [256, 257]. Cependant, ces essais, principalement réalisés en culture cellulaire, peuvent ne pas révéler le spectre global de l'activité de signalisation ou des finesses de liaison aux récepteurs de différents WNTs [252]. De plus, comme nous allons le décrire ci-dessous, il existe différents co-récepteurs pour les WNTs qui peuvent moduler la signalisation.

Tenant compte de ces observations, les phénotypes associés à la signalisation WNT peuvent être attribués à des profils d'expression distincts et uniques des gènes WNTs et à leur association avec des récepteurs et co-récepteurs spécifiques selon le processus physiologique en question.

I.2.2.2 Production et sécrétion des WNTs

Les WNTs sont des glycoprotéines sécrétées composées de 350 à 400 acides aminés, qui agissent comme des signaux intercellulaires. Toutefois, il existe encore plusieurs questions non-résolues sur la nature de la forme extracellulaire des WNTs et sur les mécanismes de leur (maturation et sécrétion. Au cours de leur synthèse, les WNTs subissent des modifications lipidiques comme l'ajout d'un groupe palmitate sur le résidu conservé Cys77. Cette modification est partagée entre tous les WNTs et est catalysée par une palmitoyl transférase spécifique appelée Porcupine [258]. La palmitoylation est principalement nécessaire à l'association des WNTs avec leurs récepteurs FZDs [259], mais elle rend également la protéine WNT hydrophobe et permet son attachement

aux membranes cellulaires. Le lipide peut donc contribuer à limiter la diffusion des WNTs et de leurs actions.

Au cours de la maturation des WNTs, la protéine transmembranaire WNTLESS (WLS) se lie aux formes lipidiques des WNTs, et est nécessaire à leur transport à la membrane plasmique où ils vont être sécrétés (**Figure I.11**). La façon dont les signaux extracellulaires des WNTs sont transférés aux cellules cibles demeure incompréhensible, mais les évidences disponibles suggèrent que les WNTs ne sont pas présents sous une forme libre. Plus probablement, les WNTs sont incorporés dans des vésicules ou exosomes sécrétoires [260-263]. Ces vésicules contiennent WLS ainsi que les WNTs sous leur forme mature. Dans un autre modèle, le transfert de WNT se fait à travers la division cellulaire et implique un contact direct entre les cellules qui est médié par les FZDs et les E3 Rnf43/Znrf3 [264]. Un autre modèle de transmission suggère que les WNTs peuvent être transférés à de longues distances à travers la migration cellulaire [265].

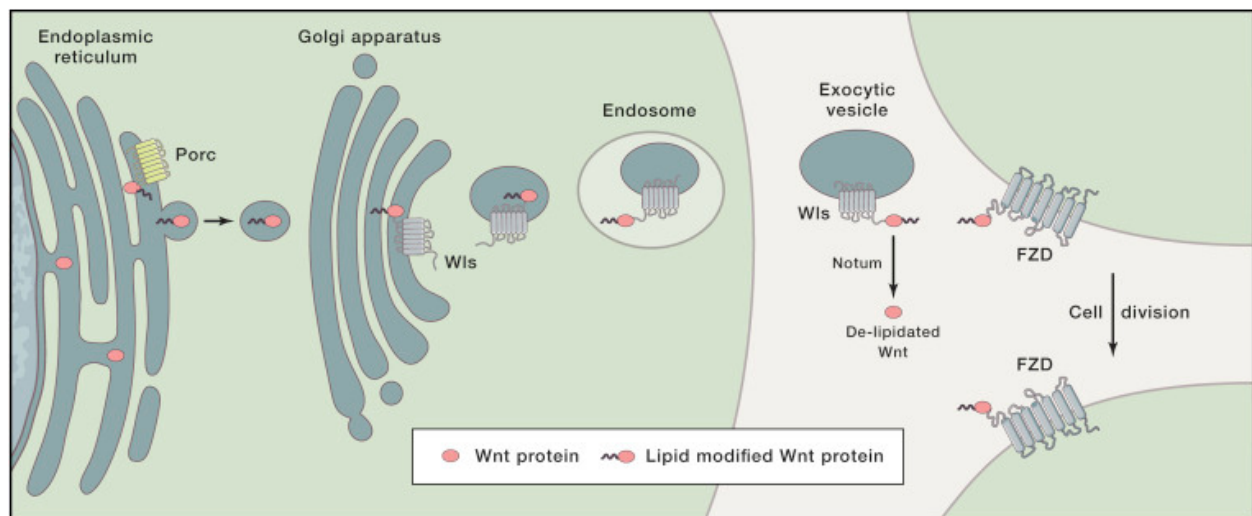


Figure I.11: la Sécrétion des WNTs. Au niveau du réticulum endoplasmique, les WNTs sont modifiés par Porcupine (Porc) pour devenir liés aux lipides. Par la suite, leur transport est régulé par WNTLESS (WLS), impliquant éventuellement des endosomes. Les WNTs sont sécrétés à partir des vésicules d'exocytose. En dehors des cellules, l'enzyme Notum peut agir comme une désacylase, éliminant les lipides et inactivant les WNTs. Après la liaison des WNTs sur les récepteurs FZDs et autres co-récepteurs, les cellules liant les WNTs peuvent se propager dans les tissus à travers la division cellulaire. L'image est prise de [252].

I.2.2.3 les récepteurs des WNTs

À la surface des cellules, les protéines WNTs se lient à un complexe récepteur composé de deux molécules, FZD et LRP5/6. Les protéines FZD ont 7 domaines transmembranaires et un domaine extracellulaire riche en cystéine N-terminal (DRC). Le DRC est le principal module interactif pour la liaison des WNTs avec des affinités de l'ordre de nM [252].

Au cours de la signalisation, les FZDs coopèrent avec LRP5/6 de telle sorte que la liaison de la protéine WNT entraîne la dimérisation des deux récepteurs [266]. Ce mécanisme entraînerait un changement conformationnel des récepteurs. En conséquence, la queue cytoplasmique de LRP, après sa phosphorylation par plusieurs protéines kinases, recrute la protéine d'échafaudage AXIN [252]. En plus des principaux récepteurs FZDs et LRP5/6, plusieurs autres molécules transmembranaires sont impliquées dans la signalisation WNT. Celles-ci incluent les récepteurs de type tyrosine kinase ROR et RYK. Une fois activés, ces récepteurs alimentent d'autres voies de signalisation dans les cellules. Il a également été montré que chacun d'eux interagit et mène à la phosphorylation de Dishevelled (DVL), qui constitue une composante commune de la voie WNT. Toutefois, les conséquences de ces modifications de DVL sont inconnues [267, 268].

D'autre part, GPR124 est un autre récepteur requis pour la signalisation appropriée des WNTs dans l'établissement de la barrière hémato-encéphalique [269, 270]. GPR124 fonctionne comme

un co-activateur de la signalisation WNT activée par WNT7A et WNT7B à travers FZD et LRP [269].

Les cascades de signalisation activées par les WNTs peuvent être divisées en trois types : Il y a principalement une voie canonique WNT/CTNNB1, et deux voies non canoniques «WNT/JNK (Jun N-terminal kinase)» et «WNT/Ca²⁺» qui ne mettent pas en jeu la protéine CTNNB1 [271].

Bien que plusieurs ligands WNTs activent préférentiellement des voies dépendantes ou indépendantes de la CTNNB1, leur activité dépend du contexte cellulaire et du récepteur engagé.

Ainsi, les WNTs ne peuvent pas être rigoureusement subdivisés selon la voie qu'ils induisent.

Ceci est dû au fait qu'il y a plus de 15 récepteurs et co-récepteurs différents des WNTs, et la combinaison particulière de ceux-ci conjointement avec un WNT donné détermine la voie activée en aval [272]. Ce code combinatoire est l'une des principales questions non résolues dans la signalisation WNT. Malgré cette complexité, il y a plusieurs travaux qui soutiennent que WNT1, WNT3A et WNT8 sont fréquemment associés à la signalisation dépendante de la CTNNB1 alors que WNT5A et WNT11 sont impliqués d'une façon prédominante dans la signalisation indépendante de la CTNNB1 [273].

La section suivante abordera principalement la voie de signalisation canonique WNT/CTNNB1.

I.2.3 La CTNNB1 : acteur essentiel de la voie WNT canonique

CTNNB1 est une protéine multifonctionnelle selon sa localisation subcellulaire et les protéines avec lesquelles elle interagit. Elle constitue un élément clé de la voie de signalisation canonique des WNTs, et de plus représente une composante importante des jonctions d'adhérence (ou d'ancrage) et du cytosquelette [274]. En effet, vers 1980, la CTNNB1 a été découverte d'une

façon indépendante par deux groupes, sur la base de ses différentes fonctions: structurelle et de signalisation [275, 276]. Le groupe de Kemler et al. a isolé la CTNNB1 en association avec un complexe de protéines formé de l' α -caténine, l' γ -caténine et l'E-cadherin décrites au niveau des jonctions cellulaires. D'ailleurs ces protéines ont été appelées 'catenin' (en latin catena qui signifie chaîne) en relation avec leur association au cytosquelette [275]. Le potentiel de signalisation de la CTNNB1 a été illustré à travers son orthologue Armadillo chez la drosophile où des mutations sur le gène armadillo ont affecté la segmentation de l'embryon [277].

I.2.3.1 Les propriétés structurales de la CTNNB1

L'habilité de la CTNNB1 à assurer des fonctions aussi diversifiées est attribuée en grande partie à sa structure (**Figure I.12**). La protéine CTNNB1 est composée de 781 résidus chez les humains comprenant une région centrale (résidus 141-664), constituée de 12 domaines répétés (R1- R12) de 42 acides aminés de type Armadillo (ARM), et flanquée par les domaines N-terminal (NTD) et C-terminal (CTD). Le NTD est essentiel à la régulation des taux de CTNNB1 cellulaire car il contient les sites consensus de phosphorylation des kinases CK1 et GSK3, tandis que le CTD est essentiel à son rôle d'activateur transcriptionnel au niveau nucléaire. Les deux domaines N- et C-terminal sont structurellement flexibles alors que la région centrale est plus rigide constituant ainsi une plateforme d'interaction avec plusieurs partenaires dans les différentes fractions subcellulaires. En effet, plusieurs études biochimiques et structurales ont révélé que les nombreux partenaires de la CTNNB1 partagent des sites de liaison qui se chevauchent au niveau de la région centrale, suggérant que plusieurs de ces interactions sont mutuellement exclusives. Cette exclusivité est aussi valide pour les partenaires clés comme E-

cadherin (au niveau des jonctions d'adhérence), APC (partenaire principal au niveau de complexe de destruction) et TCF/LEF (partenaire principal au niveau du noyau) [274].

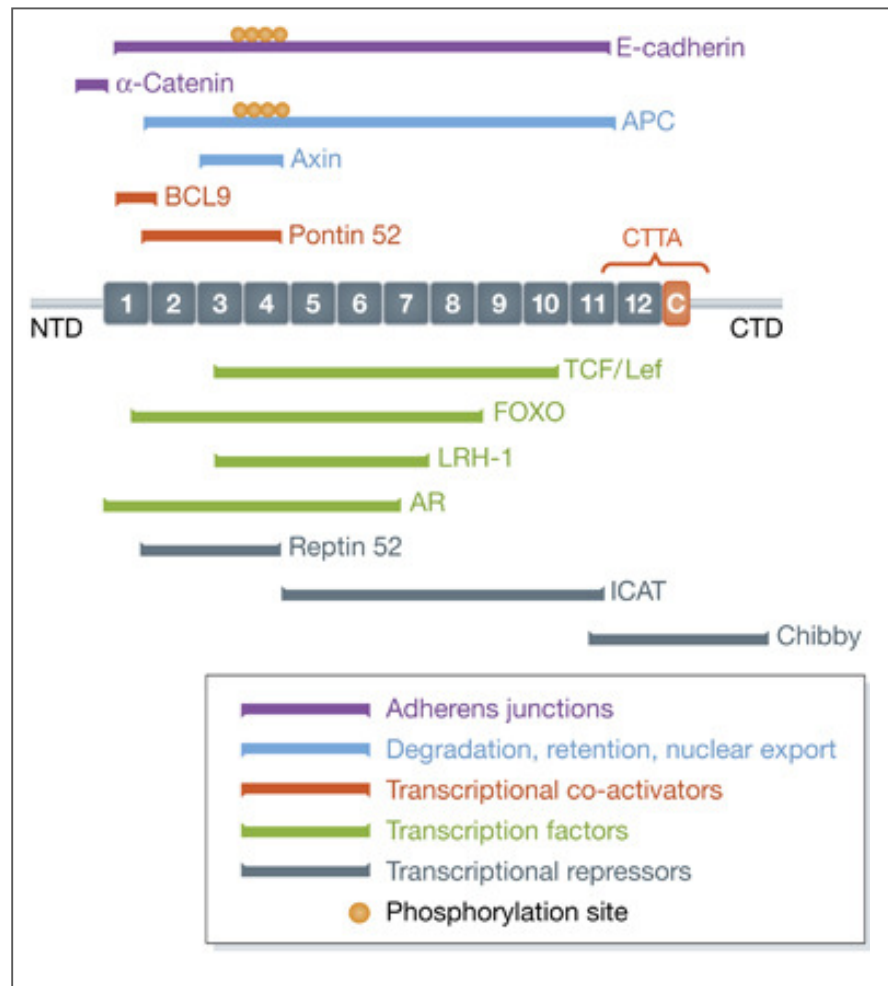


Figure I.12 : Structure de la CTNNB1. La CTNNB1 sert de plateforme de liaison pour une multitude de partenaires d'interaction dans les jonctions d'adhérence, dans le cytoplasme et dans le noyau. La protéine CTNNB1 est constituée d'une région centrale composée de 12 répétitions d'armadillo (boîtes numérotées), flanquées d'un domaine amino-terminal (NTD) et d'un domaine carboxy-terminal (CTD). Entre la dernière répétition de l'Armadaillo et la partie flexible du CTD se trouve l'hélice conservée C (C). Les barres colorées montrent des sites de liaison validés expérimentalement pour les partenaires d'interaction β -caténine. Les petits cercles indiquent des sites de phosphorylation sur l'E-cadhérine ou l'APC qui améliorent les interactions. L'image est prise de [274].

I.2.3.2 Le complexe de destruction contrôle la stabilité de la CTNNB1

L'élément principal de la voie de signalisation canonique des WNT repose sur la régulation de la stabilité de la protéine clé CTNNB1. En absence d'une stimulation par les WNTs, CTNNB1 est séquestrée dans un complexe dit de destruction (CD) formé de l'AXIN, de l'APC (Adenomatous Polyposis Coli) et des deux kinases GSK3 β (Glycogen Syntase Kinase 3 beta) et CK1 (Casein Kinase 1) [278] (**Figure 12**). La phosphatase PP2A s'associe aussi avec ce complexe [279-282]. Quand les récepteurs FZDs/LRP ne sont pas engagés par les ligands WNTs, la CTNNB1 est constamment phosphorylée par CK1 au niveau de la Ser45 qui permet la phosphorylation subséquente des résidus Ser33, Ser37 et Thr41 par la kinase GSK3 β [283-287]. La phosphorylation de ces résidus du domaine N-terminal de la CTNNB1 lui permet d'être reconnue par la protéine β -TrCP (Beta Transducing repeat Containing Protein) dont l'activité E3 ligase permet l'ubiquitination de la CTNNB1 et sa dégradation par le protéasome [288, 289]. La liaison de certains ligands WNTs sur les récepteurs FZDs et les co-récepteurs LRP5/6 initie une série d'événements moléculaires qui commence par le recrutement de la protéine cytoplasmique DVL au niveau du récepteur FZD, ensuite cette association conduit à la phosphorylation de LRP5/6 par CK1 [290, 291]. Cet événement est crucial pour la déstabilisation ou l'inactivation fonctionnelle du complexe de destruction. Malgré les recherches intenses entreprises dans ce domaine, les mécanismes à travers lesquels les WNTs inhibent la dégradation de la CTNNB1 sont loin d'être résolus. Les modèles classiques proposés suggèrent principalement deux modes d'emploi: 1-Soit une déstabilisation du complexe de destruction en limitant par exemple

l'accessibilité de ces composants clés, comme la séquestration au niveau de la membrane du complexe AXIN1/GSK3 β [292, 293]. 2-Soit l'inactivation fonctionnelle de son fonctionnement comme l'inhibition de l'activité kinase de GSK3 β [294, 295] ou la déphosphorylation de CTNNB1 par PP2A (Protein Phosphatase 2A) sur les résidus phosphorylés par CK1/GSK3 [296]. Toutefois, des modèles plus récents sont proposés ; l'analyse biochimique du CD endogène a révélé que la liaison des WNTs entraîne un blockage dans l'ubiquitination de la CTNNB1 phosphorylée au niveau d'un CD intact. En conséquence, le CD devient saturé par la forme phosphorylée de la CTNNB1, entraînant l'accumulation de la CTNNB1 nouvellement synthétisée, libre de se déplacer vers le noyau et d'activer les gènes cibles [297, 298]. D'autre part, plusieurs études ont identifié un domaine de régulation hautement conservé dans APC appelé CID (Catenin Interaction Domain)[299, 300]. Le CID semble être essentiel dans la régulation négative des niveaux de la CTNNB1 et l'activité transcriptionnelle déclenchée par les WNTs. En accord avec ça, le CID est situé directement dans le cluster de mutations d'APC qui représente un site de troncatures communes d'APC dans le cancer. Il a été proposé que le CID promouvait l'ubiquitination de la CTNNB1 en stabilisant son association avec APC [301]. Une étude plus récente a proposé un autre modèle: la phosphorylation médiée par la GSK3 autour de la région CID induit un changement conformationnel de la protéine APC permettant l'accessibilité de la E3-ligase à la CTNNB1 phosphorylée [302].

La CTNNB1 libre, non phosphorylée échappe alors à la dégradation et s'accumule au niveau du cytoplasme puis se déplace au noyau où elle va se lier avec des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor)[303])[303]. Le site de

liaison de TCF sur l'ADN est 5'-AGATCAAAGG-3'[304], il est largement utilisé dans les rapporteurs WNT/TCF comme pTOP-Flash. Les protéines TCF/LEF ont une habilité restreinte à initier la transcription. En effet, en absence d'une stimulation par les WNTs, les facteurs TCF/LEF empêchent la transcription des gènes en interagissant avec des répresseurs transcriptionnels comme Groucho et HDAC1 (Histone DeAcetylase1). La liaison de la CTNNB1 les convertissent en activateurs transcriptionnels en ramenant des co-activateurs tels que P300/CBP, TBP(TATA-Binding Protein), BCL9 et Pygo et déclenche ainsi la transcription de plusieurs gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires [274].

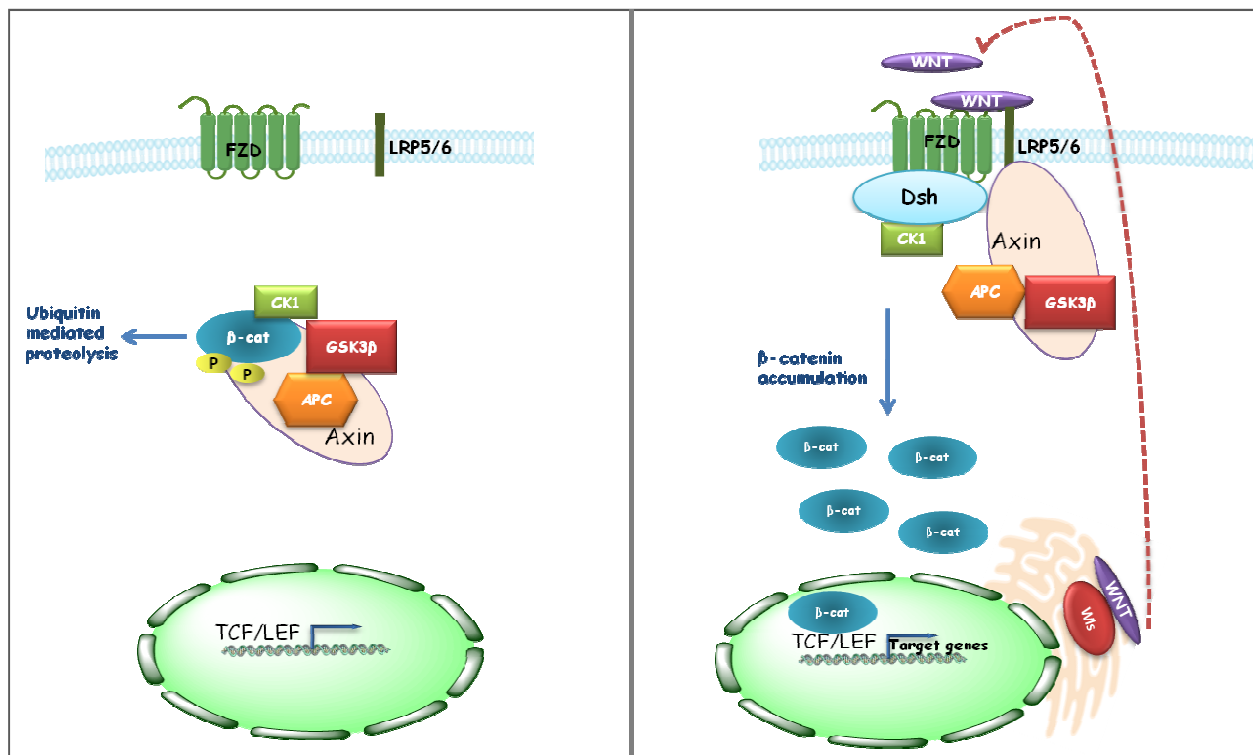


Figure I.13: Schéma simplifié de la signalisation WNT/CTNNB1. Panneau gauche: en absence de ligand WNT, la CTNNB1 est séquentiellement phosphorylée par CK1 et GSK3β dans le complexe de destruction (CD) au niveau cytoplasmique. La E3 ligase β-TrCP reconnaît la CTNNB1 phosphorylée et favorise son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome.

Panneau de droite: la signalisation WNT/CTNNB1 est activée par la liaison du ligand WNT au récepteur FZD et aux corécepteurs LRP5/6, entraînant le recrutement de DVL et du CD à la membrane, ce qui inactive la dégradation de la CTNNB1 par le CD. La CTNNB1 stabilisée et accumulée au cytoplasme est transloquée au noyau pour activer la transcription des gènes cibles[252].

I.2.3.3 Le recrutement TCF-LEF indépendant de la CTNNB1 sur la chromatine :

Il y a plusieurs évidences qui indiquent que la CTNNB1 peut s'associer avec d'autres facteurs de transcription (FT) outre les TCF/LEF (**Tableau 2**). Ces FTs peuvent généralement démarrer la transcription par eux-même ou en association avec d'autres co-facteurs, contrairement à l'exigence ultime de la CTNNB1 pour démarrer la transcription TCF/LEF. Plus intéressant, l'habilité des ces FTs à interagir avec la CTNNB1 fournit un niveau additionnel de contrôle de la transcription et d'interférence croisée avec la voie WNT/CTNNB1. De plus, l'interaction de la CTNNB1 avec d'autres FTs peut entraîner une compétition pour la CTNNB1 et affecter ainsi la transcription médiée par TCF/CTNNB1. Certains récepteurs nucléaires, comme le récepteur des androgènes, peut agir via ce mécanisme. Dans les lignées cellulaires du cancer du colon, le récepteur aux androgènes activé peut se lier à la CTNNB1, l'utilisant pour renforcer sa propre activité transcriptionnelle au détriment de celle du TCF [305, 306]. La CTNNB1 s'associe également avec le récepteur d'oestrogène en absence et en présence du ligand [307]. Toutefois la résultante transcriptionnelle de ces interactions n'est pas bien éclaircie. L'interaction de la CTNNB1 avec les récepteurs nucléaires peut présenter aussi un aspect coopératif. Un exemple pertinent est l'action coopérative entre le récepteur nucléaire LRH1 (Liver Receptor Homologue 1) et le complexe TCF/CTNNB1. La CTNNB1 peut directement s'associer à LRH1 et améliorer l'expression de ces gènes cibles (par exemple cycline E1). D'autre part, LRH1 peut servir de co-

activateur transcriptionnel de la CTNNB1; une cible de TCF/CTNNB1 dont l'expression est ainsi améliorée est la cycline D1 qui, conjointement avec la cycline E1, favorise la prolifération cellulaire dans les cellules pancréatiques et hépatiques. De plus, LRH1 s'est avérée être une cible directe TCF/CTNNB1, suggérant le potentiel d'une boucle de rétroaction positive [308, 309].

La CTNNB1 joue également un rôle important dans les conditions de stress hypoxique. L'hypoxie augmente considérablement les niveaux du facteur HIF1 α (Hypoxia Induced Factor 1 α). Ce dernier séquestre la CTNNB1 loin de son partenaire classique TCF et l'utilise pour induire sa propre transcription en entraînant la réduction de la transcription TCF-CTNNB1 [310]. Toutefois, ce rôle de HIF1 α est spécifique au type cellulaire. D'autre part, la réduction des taux d'O₂ peut altérer les fonctions mitochondriales et contribuer au stress oxydatif qui génère des espèces réactives d'oxygène (ROS). De telles conditions activent et régulent positivement les FTs comme FOXO, qui similairement à HIF1 α , entrent en compétition avec le TCF pour la CTNNB1. Ainsi, la CTNNB1 peut se lier directement aux facteurs FOXO et améliorer leurs activités transcriptionnelles [311]. Une telle compétition entre FOXO et TCF pourrait contribuer à la résistance à l'insuline et au diabète, et semble également jouer un rôle important dans le développement osseux [312-314]. Un complexe FOXO-CTNNB1 peut jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme hépatique et de la gluconéogenèse [315]. La CTNNB1 s'associe aussi avec le FT SOX17 et régule l'expression des gènes cibles qui sont importants durant la gastrulation des vertébrés [316]. Au niveau des cellules souches embryonnaires, il est bien connu que la signalisation WNT/CTNNB1 régule la pluripotence des cellules souches de différentes manières à travers TCF/LEF [317]. Toutefois, l'interaction de la CTNNB1 avec

OCT4 renforce la pluripotence des cellules souches indépendamment de TCF/LEF [318], supportant ainsi la notion que la CTNNB1 peut réguler de grands processus physiologiques en adoptant des mécanismes alternatifs. La CTNNB1 agit aussi comme un co-activateur qui stabilise l'activité transcriptionnelle de Smad2 et Smad3 afin de promouvoir la transition épithélio mésenchymateuse (TEM) induite par TGF- β [319]. Plus précisément, le même groupe a identifié plus récemment que l'autophagie induite par TGF- β dégrade la E-cadherine, libérant la CTNNB1 membranaire qui forme un complexe avec Smad2, ce complexe active la transcription d'ILK (Integrin Linked Kinase) favorisant ainsi la TEM [320].

Par ailleurs, plusieurs évidences soulignent que la CTNNB1 régule l'expression des gènes cibles de NF- κ B en s'associant directement avec les facteurs NF- κ B au niveau des promoteurs cibles. Curieusement, cette association a été principalement liée à la co-répression génique des activités transcriptionnelles de NF- κ B [321].

Les premières évidences d'interférence entre NF- κ B et la CTNNB1 ont été repérées dans les cellules tumorales. D'abord, dans des cellules de cancer de colon et de sein où la CTNNB1 forme un complexe avec RELA et p50, il en résulte la réduction de leur capacité à lier l'ADN et donc de leur activité transcriptionnelle sur les gènes cibles comme FAS et TRAF1 [322]. De plus, une forte corrélation inverse a été détectée entre les niveaux d'expression de la CTNNB1 et FAS dans les tissus primaires de cancer de colon et de sein, suggérant que la CTNNB1 régule l'activité de NF- κ B *in vivo*. Par la suite, une évidence directe du rôle de la CTNNB1 dans la régulation transcriptionnelle des activités de NF- κ B est décrite dans les cellules de cancer de prostate, où la CTNNB1 affecte la transcription du gène suppresseur de métastases KAI1 [323].

En effet, l'expression de KAI1 est activée par la sous-unité p50 de NF- κ B avec l'implication des co-activateurs Pontin et Tip60. Si KAI1 est exprimé, le cancer de prostate a un faible potentiel de métastases. Mais dans les cellules métastatiques, la CTNNB1 est activée, interagit directement avec p50, recrute les co-represseurs Reptin et HDAC, et déplace le complexe de co-activateur Tip60 afin de réprimer la transcription. C'est la balance entre les complexes transcriptionnels de co-activateurs et co-répresseurs qui détermine le niveau d'expression de KAI1 et donc du pouvoir métastatique du cancer de la prostate. L'effet de co-répression de la CTNNB1 sur NF- κ B a été décrit aussi dans des cellules non-tumorales telles que les chondrocytes [324], les cellules épithéliales [325, 326], les fibroblastes [327], les ostéoclastes [328] et les hépatocytes [329]. Mais, la majorité de ces études décrivent des mécanismes variés d'action de la CTNNB1 sur NF- κ B (comme sa rétention au niveau cytoplasmique ou la réduction de son acétylation par CBP, etc) sans toutefois présenter des preuves directes sur le recrutement de la CTNNB1 au niveau des promoteurs cibles de NF- κ B d'une façon indépendante de TCF/LEF. Finalement, la CTNNB1 a été démontré comme un co-facteur transcriptionnel d'IRF3 qui régule l'expression d'IFNB1 et d'ISGs suite à l'infection virale [123, 330, 331], mais nous reviendrons plus en détail sur la fonction de cette association dans les prochaines sections de cette introduction.

Le facteur recruté	La fonction associée à l'interaction avec la CTNNB1	Références
Le récepteur d'androgène	Peut moduler la localisation nucléaire de la CTNNB1. Réprime l'activité transcriptionnelle du complexe TCF-CTNNB1 en entrant en compétition avec le TCF sur la CTNNB1.	[305, 306]

LRH1	Induit la prolifération cellulaire par l'induction concomitante de cycline D1 et E1. Alors que la CTNNB1 co-active la transcription médiée par LRH-1 sur le promoteur de cycline E1, le LRH-1 agit comme un coactivateur puissant de la CTNNB1-TCF4 sur le promoteur de la cycline D1.	[308, 309]
HIF1 α	Active la transcription médiée par HIF1 α favorisant ainsi la survie cellulaire et l'adaptation à l'hypoxie.	[310]
FOXO	Active la transcription des gènes régulés par FOXO qui sont particulièrement importants dans les conditions de stress oxydatif.	[311]
SOX17	Coopère avec la CTNNB1 pour la transcription génique de l'endoderme durant la gastrulation des vertébrés	[316]
OCT4	Régule la différenciation des cellules souches embryonnaires en renforçant leur pluripotence bloquant ainsi une différenciation efficace.	[318]
NF- κ B p50, Reptin, HDAC1	Réprime l'expression du suppresseur de métastases KAI1 dans les cellules de cancer de prostate.	[323]
NF- κ B p65, p300, CBP	Active l'expression d'IL6 au niveau des cellules pulmonaires	[332]
NF- κ B p65	Réprime l'expression des MMPs et d'IL6 dans le chondrocytes humaines	[324]
SMAD3	Active l'expression associée aux FTs SMAD2 et SMAD3 impliqués dans la transition épithélio mésenchymateuse induite par TGF- β	[319, 320]
IRF3	Régule l'expression d'IFNB1 et d'ISG lors d'infection virale	[123, 330, 331]

Tableau I.2: Les facteurs de transcription autres que LEF/TCF avec lesquels la CTNNB1 peut s'associer

I.2.3.4 Régulation des fonctions de la CTNNB1 par les modifications post-traductionnelles

Le degré avec lequel la CTNNB1 assure des fonctions structurelles et de signalisation est dicté par la disponibilité de ces partenaires de liaison. Un thème émergent d'investigation est que ces interactions de liaison sont principalement régulées par des MPTs notamment; la phosphorylation, l'ubiquitination et l'acétylation. Ainsi, les stimuli provenant des différents événements cellulaires peuvent avoir un impact sur les fonctions finement régulées de la CTNNB1 à travers l'induction de MPTs particulières.

Type de MPT	Site	L'enzyme impliquée	Fonction	Références
La phosphorylation Régulant la stabilité de la CTNNB1	Ser 45	CK1 α	Apprêter la CTNNB1 pour sa phosphorylation subséquente par GSK3 β	[283, 284]
	Ser33 Ser37 Thr41	GSK3 β	Forme le dégron ou site de reconnaissance de β -TrCP menant à l'ubiquitination puis dégradation de la CTNNB1	[285-287]
	Ser33 Ser37 Ser45	PKC	Induit la dégradation de la CTNNB1 indépendamment de GSK3 β	[333]
	Ser45	CyclinD/ Cdk6	Phosphorylation initiale de la CTNNB1 qui est suivie par la phosphorylation de GSK3 β et la dégradation de la CTNNB1.	[334]
	Ser45 Ser33 Ser37 Thr41	CyclineA /Cdk2	Entraîne la dégradation rapide de la CTNNB1 durant la phase G1 du cycle cellulaire.	[335]
La phosphorylation interférant avec les fonctions d'adhésion de la CTNNB1	Ser675	PKA	Stabilise la CTNNB1 en inhibant son ubiquitination	[336]
	Tyr142	Met	Favorise la localisation nucléaire de la CTNNB1 et la transcription de TCF4 afin de promouvoir la croissance des axones.	[337, 338]
	Tyr142	Fyn/Fer	Entraîne la dissociation entre la CTNNB1 et α -catenin au niveau des jonctions d'adhérence	[339]
	Tyr142	Syk	Entraîne la localisation de la CTNNB1 au niveau des centrosomes pour la régulation de la progression de la mitose.	[340]

	Ser 654	PKA	Promouvoit l'interaction de la CTNNB1 avec des co-activateurs transcriptionnels comme CBP et TBP.	[341]
	Ser 552	AKT	Augmente les niveaux cytosoliques et nucléaires de la CTNNB1 et son association avec le co-activateur 14-3-3ζ.	[342]
L'ubiquitination favorisant la dégradation de la CTNNB1	Lys26 Lys49	β-TrCP	Promouvoit l'ubiquitination de type K48 et la dégradation de la CTNNB1 par le protéasome.	[343]
	Lys666 Lys671	SIAH-1	Attache des chaînes de polyubiquitine de type K11 sur la CTNNB1 qui mène à sa dégradation par le protéasome. Le processus est dépendant de l'activation de p53.	[344, 345]
	Non-identifié	JADE1	Ubiquitine la CTNNB1 en présence et en absence des signaux WNT pour un contrôle optimal de la signalisation WNT.	[346]
	Non-identifié	c-CBL	Cible pour ubiquitination la CTNNB1 après la stimulation WNT au niveau nucléaire, il en résulte l'inhibition de la transcription des gènes cibles de WNT IL8 et VEGF.	[347, 348]
	Non-identifié	TRIM33	E3 ligase ubiquitine et réduit les niveaux de CTNNB1 nucléaire. Requiert phosphorylation Ser 715 par PKC. TRIM33 est considéré comme un suppresseur de tumeur capable d'abolir la prolifération des cellules tumorales et la tumorigenèse en dégradant la CTNNB1 nucléaire.	[349]
	Non-	MULE	Cible la CTNNB1 pour la dégradation dans les	[350]

	identifié		conditions d'hyperactivation des signaux WNT	
L'ubiquitination favorisant la stabilité de la CTNNB1	Non-identifié	EDD	Stabilise la CTNNB1 et augmente son activité en entraînant son ubiquitination de type K29 et K11.	[351]
	Lys394	Rad6B	Augmente la stabilité de la CTNNB1 en y attachant des chaînes de polyubiquitine de type K63 dans les cellules de cancer de sein.	[352, 353]
	Non-identifié	FANCL	Augmente l'activité et l'expression des gènes cibles de la CTNNB1 en y attachant des chaînes de polyubiquitine de type K11 ou K63 dans les cellules souches hématopoétiques.	[354]
	Lys19	Ube2s	Augmente la stabilité de la CTNNB1 en y attachant des chaînes de polyubiquitine de type K11 sur le résidu Lys19 qui est normalement ubiquitiné par β -TrCP dans le CD.	[355]
L'acétylation de la CTNNB1	Lys49	CBP	Acétyle et régule la signalisation WNT. Les mutants de la CTNNB1 ne pouvant être acétylés sur la Lys49 activent la transcription cible spécifique de gènes comme c-MYC, suggérant que cette MPT régule négativement la signalisation WNT.	[356]
	Lys345	p300	Augmente l'activité transcriptionnelle de la CTNNB1 en renforçant son affinité avec TCF4	[357]
	Lys19 Lys49	PCAF	Acétyle et stabilise la CTNNB1, induit sa translocation nucléaire et augmente son activité transcriptionnelle, régulant ainsi positivement la signalisation WNT	[358]

Tableau I.3: Les modifications post-traductionnelles de la CTNNB1

I.2.3.4.1 Régulation de la CTNNB1 par la phosphorylation

I.2.3.4.1.1 La phosphorylation régule la stabilité de la CTNNB1

Comme décrit antérieurement, en absence d'une stimulation WNT, le pool cytoplasmique de la CTNNB1 est constamment phosphorylé par CK1 α au niveau de la Ser45 [283, 284], qui précède nécessairement la phosphorylation subséquente de la CTNNB1 par GSK3 β au niveau des Ser33/Ser37/Thr41 [285-287]. Ces phosphorylations provoquent la dégradation de la CTNNB1 par le protéasome suite à son ubiquitination par β -TrCP, ce qui maintient les niveaux cytoplasmiques et nucléaires de la CTNNB1 très faibles [359].

Compte tenu de ce rôle central de la phosphorylation dans la régulation de la signalisation de la CTNNB1, le CD peut recevoir des stimuli provenant de voies de signalisation autres que la voie WNT canonique. À cet égard, les sites de phosphorylation de la CTNNB1 par GSK3 β et CK1 α peuvent être phosphorylés par la PKC (Protein Kinase C) et conduisent à la dégradation de la CTNNB1 indépendamment de GSK3 β [333]. Ces données ont permis d'expliquer comment des voies de WNTs non-canoniques activant PKC arrivent à contrer la signalisation de la CTNNB1 en provoquant sa dégradation. Comme exemple, on trouve l'implication de WNT5A dans l'induction de la dégradation de la CTNNB1, empêchant ainsi la progression de cancer de colon, de thyroïde et des cancers hépato-cellulaires (CHCs) [360-362], et de WNT11 dans les CHC [363]. Le résidu Ser45 de la CTNNB1 peut également être soumis à une régulation croisée par CyclinD/Cdk6 et CyclineA /Cdk2, ce qui peut permettre aux régulateurs du cycle cellulaire d'atténuer les signaux WNT, qui normalement fluctuent au cours du cycle cellulaire [334, 335,

364]. À l'inverse des phosphorylations menant à la dégradation de la CTNNB1, il y a celles qui favorisent sa stabilisation ; l'activation de PKA (protein Kinase A) entraîne l'augmentation des niveaux protéiques de la CTNNB1 en catalysant sa phosphorylation au niveau de Ser675, il en résulte que PKA peut contrôler l'expression des gènes à travers la CTNNB1 et TCF4 [336].

Par ailleurs, d'autres voies de signalisation interfèrent avec la phosphorylation de la CTNNB1 au niveau du CD; les signalisations Notch et WNT/CTNNB1 se croisent souvent dans la régulation de plusieurs processus physiologiques [365]. Il a été démontré que Notch interagit directement avec la CTNNB1-active (déphosphorylée dans les positions Ser33/Ser37/Thr41) et régule négativement ces niveaux protéiques contrôlant ainsi l'état prolifératif des cellules en expansion. Bien que le mécanisme exact ne soit pas déterminé, Notch entraîne la dégradation de la CTNNB1-active indépendamment de l'activité de GSK3 β qui se passe au niveau du CD [366, 367]. De même, le complexe TSC1/TSC2 qui régule la signalisation mTOR régule négativement la stabilité de la CTNNB1 en intervenant au niveau du CD [368]. Les mécanismes à travers lesquels ces différents composants moléculaires affectent la structure et les fonctions du CD restent à déterminer. Néanmoins, ces données indiquent que les signaux de WNT/CTNNB1 sont soumis à un contrôle subtil par diverses cascades de signalisation selon le contexte physiologique.

I.2.3.4.1.2 La phosphorylation régule les fonctions d'adhésion et de signalisation de la CTNNB1

Au niveau des jonctions cellulaires, la phosphorylation de la CTNNB1 affaiblie souvent son interaction avec le complexe E-cadherin/ α -catenin causant sa réorientation vers le mode de

signalisation. Par exemple, la phosphorylation de la CTNNB1 au niveau de Tyr142 (PTyr142 CTNNB1) implique le passage de la CTNNB1 de ses fonctions adhésives à des fonctions transcriptionnelles indépendantes de WNT [337], qui sont régulées par la kinase Met et HGF (Hepatocyte Growth Factor) [337, 338], et par d'autres tyrosine kinases comme Fyn/Fer [339]. Par conséquent, la CTNNB1 se dissocie du complexe d'adhésion, se localise dans le noyau et favorise la migration cellulaire et la croissance des axones dans les neurones [337, 338]. Curieusement, BCL9-2 (B-Cell Lymphoma9-2; co-activateur nucléaire de la CTNNB1 [369]) s'associe spécifiquement avec PTyr142 CTNNB1 engendrant l'augmentation de la transcription des gènes cibles qui sont associés à l'oncogenèse [370]. Plus récemment, il a été démontré que la phosphorylation Tyr142 de la CTNNB1 par Syk régule la cohésion des centrosomes durant le cycle cellulaire [340].

Une MPT très étudiée de la CTNNB1 est la phosphorylation au niveau de la Tyr654 dans le dernier domaine ARM par les récepteurs à activité tyrosine kinase RTK (exemple EGFR) ou la kinase c-SRC. Cette phosphorylation réduit aussi l'ancrage de la CTNNB1 au niveau des jonctions et augmente son activité transcriptionnelle [371]. L'effet de cette MPT a été validé *in vivo* par la génération des souris mutantes d'une façon conditionnelle qui expriment une forme phospho-mimétique de la CTNNB1 (CTNNB1Y654E) [341]. Les souris homozygotes pour cette mutation meurent à l'état embryonnaire en exposant des profils ressemblant à ceux causés par une activation aberrante de la voie WNT/CTNNB1. De plus, la phosphorylation en Tyr654 entraîne un changement conformationnel de la CTNNB1 qui permet à PKA de phosphoryler

d'autres sites comme la Ser675 qui augmente l'interaction de la CTNNB1 avec CBP et TBP (TATA Binding Protein) [341] [371].

Un autre exemple est la phosphorylation de la CTNNB1 au niveau de la position Ser552 par la kinase AKT, induisant sa dissociation des jonctions cellulaires et son accumulation aux niveaux cytosolique et nucléaire. Par la suite, son association avec 14-3-3 ζ (régulateur positif de son activité [372]) est renforcée, résultant en l'augmentation de son activité transcriptionnelle [342]. Il est important de noter que la phosphorylation Ser552 AKT-dépendante de la CTNNB1 est induite par plusieurs agents infectieux incluant : *Salmonella* [373], *Citrobacter rodentium* [374] *Listeria monocytogene* [123], et suite à l'induction virale de la signalisation TLR3 [375]. Toutefois, l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de la CTNNB1 dans ces conditions a été principalement associée avec la régulation des processus inflammatoires.

Par ailleurs, la translocation nucléaire de la CTNNB1 accumulée au niveau cytoplasmique est nécessaire à la signalisation médiée par les WNTs canoniques. Cependant, les mécanismes moléculaires régulant la localisation nucléaire de la CTNNB1 ne sont pas clairement établis [376]. Néanmoins, un rapport intéressant a révélé que ce mécanisme est régulé via la phosphorylation de la CTNNB1 [377]. En effet, cette étude a démontré que l'activation de RAC1/JNK2 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1/C-JUN NH2-terminal kinase 2) est nécessaire à la localisation nucléaire de la CTNNB1 en réponse à la stimulation par WNT. Plus précisément, le traitement avec WNT3A entraîne l'activation de RAC1 suivie de l'activation de JNK2, qui phosphoryle alors Ser191 et Ser605 de la CTNNB1 résultant en sa localisation nucléaire.

I.2.3.4.2 Régulation de la CTNNB1 par l'ubiquitination

L'ubiquitination et la dégradation protéasomique de la CTNNB1 constitue un mécanisme crucial de régulation de la signalisation WNT/CTNNB1. La principale caractéristique de cette signalisation est le contrôle rigoureux des niveaux protéiques de la CTNNB1 en absence d'une stimulation WNT. Cette régulation médiée par la phosphorylation de la CTNNB1 par CK1 et GSK3 β mène à son ciblage par le complexe ubiquitin ligase SKP1/CULLIN1/F-box/ β -TrCP (SCF $^{\beta$ -TrCP). Il s'en suit l'attachement des chaînes de poly-ubiquitin de type K48 aux résidus lys19 et lys49 causant la dégradation de la CTNNB1 par le protéasome [343]. Comme décrit plus haut, il y a plusieurs contextes cellulaires qui peuvent interférer avec la stabilisation de la CTNNB1 d'une façon dépendante ou indépendante des WNTs. Ainsi, il n'est pas surprenant que différents systèmes de E3 ligases sont impliqués dans la dégradation de la CTNNB1 pour une régulation optimale de son activité. Parmi les systèmes indépendants de WNT décrits, on trouve la E3 ligase SIAH-1 (Seven in absentia homolog-1) qui est induite par p53 en réponse à divers stimuli (comme arrêt de cycle cellulaire, suppression de tumeur, apoptose etc) [378].

L'activation de SIAH-1 mène à la formation d'un complexe unique de type SCF composé de SIP (SIAH-1 Interacting Protein), SKP1, TBL1 (Transducin β -like 1) et APC [344, 345]. Ce complexe induit la dégradation de la CTNNB1 indépendamment de la phosphorylation médiée par GSK3 β et de la dégradation par β -TrCP. La signification physiologique de la dégradation ciblée par Siah-1 de la CTNNB1 a été appuyée par la découverte que cette voie est directement ciblée par l'oncoprotéine (LMP1) du virus oncogène EBV (Epstein–Barr virus) afin d'induire la signalisation CTNNB1 et transformer des cellules B en repos en cellules lymphoblastoïdes

prolifératives [379]. Par la suite, une étude a identifié l'isoreserpine, comme molécule atténuant la fonction de la CTNNB1 via l'activation de SIAH-1 et la dégradation protéasomique subséquente de la CTNNB1[380].

Parmi les mécanismes de la dégradation de la CTNNB1 qui dépendent de la stimulation WNT mais se distinguent du système β -TrCP on trouve : JADE1 [346], c-CBL [347, 348], TRIM33[349] et récemment MULE [381]

JADE- 1 qui est une composante de la E3 ligase pVHL (Von Hippel–Lindau protein), est capable d'interagir et d'ubiquitiner la CTNNB1. Contrairement à β -TrCP qui régule la CTNNB1 en absence de la stimulation WNT, JADE-1 peut déstabiliser les niveaux protéiques de la CTNNB1 avant et après la stimulation par les WNTs. De plus, comme JADE-1 est un gène suppresseur de tumeur de rein, cette étude a fait le lien entre une voie spécifique de contrôle négatif de la tumorigenèse du rein médiée par pVHL, et la voie WNT/CTNNB1, fournissant des cibles thérapeutiques contre le cancer du rein [346].

Par ailleurs, la protéine C-CBL (Casitas B-lineage Lymphoma) qui, suite à une stimulation par les WNTs, est phosphorylée puis transloquée dans le noyau où elle se lie avec la CTNNB1 active afin d'induire sa dégradation [348] . Une étude subséquente a démontré que l'activité de C-CBL sur la CTNNB1 inhibe les gènes pro-angiogéniques qui sont induits par les WNTs comme l'IL-8 et VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ce qui souligne un nouveau niveau de régulation de l'angiogenèse et la tumorigenèse [347, 348]. D'une façon similaire, TRIM33 (TRi partite Motif-containing protein 33) a été décrite comme réduisant aussi l'abondance de la CTNNB1 active au niveau du noyau. Cette régulation nécessite la phosphorylation préalable de la

CTNNB1 au niveau de la Ser715 par PKC. De plus, TRIM33 est désignée comme un suppresseur de tumeur dont les niveaux sont inversement corrélés avec ceux de la CTNNB1 dans certaines tumeurs du cerveau [349]. Plus récemment, un rapport a démontré que la E3 ligase MULE (Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3) peut se lier directement à la CTNNB1 afin de médier sa dégradation dans les conditions d'hyperprolifération cellulaire [350]. Ces conditions se produisent par exemple lorsque des mutations au niveau d'APC inactivent le complexe de destruction, entraînant la stabilisation de la CTNNB1 et l'activation constitutive de la signalisation WNT. Ces résultats soulignent l'importance de Mule comme un suppresseur de tumeur qui prévient le cancer de colon caractérisé par une hyperactivation de la signalisation WNT.

Outre la polyubiquitination menant à la dégradation de la CTNNB1, EDD, Rad6B, FANCL et Ube2s sont toutes des facteurs qui augmentent la stabilité de la CTNNB1 en y attachant des chaînes de polyubiquitines autres que celles menant à la dégradation par le protéasome. Plus en détail, la E3 ligase EDD modifie la CTNNB1 avec les chaînes de polyubiquitines de type K29 ou K11 pour améliorer son accumulation cellulaire [351]. Deux autres études ont montré que la E2 Rad6B permet l'attachement des chaînes de polyubiquitines de type K63 au niveau du résidu Lys394 de la CTNNB1 pour augmenter sa stabilité dans les cellules du cancer de sein [352, 353]. La E3 ligase FANCL modifie la CTNNB1 dans des résidus Lys autres que Lys19 ou 49 avec une chaîne de polyubiquitine de type K11 ou K63 pour augmenter son accumulation et son activité dans les cellules souches hématopoïétiques [354]. Plus récemment, Ube2s est identifiée comme une E3 ligase qui attache des chaînes de polyubiquitines de type K11 au niveau du résidu Lys19

de la CTNNB1 [353]. Cette modification a eu pour résultat un effet antagoniste contre le CD et la dégradation de la CTNNB1 médiée par β -TrCP. En conséquence, la stabilité de la CTNNB1 a été renforcée, favorisant ainsi son accumulation cellulaire. Curieusement, la manipulation du niveau d'expression d'Ube2s seul semble être suffisante pour contrôler la prolifération et la métastase des cellules de cancers colorectaux (CCR). Ainsi, cette étude suggère Ube2s comme une cible potentielle pour un futur traitement des CCRs [355].

I.2.3.4.3 Régulation de la CTNNB1 par l'acétylation

L'acétylation régule l'activité de quelques composants de la signalisation WNT y compris la CTNNB1 et TCF [343]. La CTNNB1 est acétylée par l'acétyltransférase CBP au niveau de la lys49 [356]. Les mutations de la CTNNB1 au niveau de la lys49 résultent en une activation plus accrue de la transcription spécifique du gène C-MYC qui se trouve dans plusieurs cancers, ce qui suggère que l'acétylation médiée par CBP régule négativement la signalisation WNT d'une façon distinctive à certains promoteurs [356]. Plus récemment, cette même modification de la CTNNB1 a été associée avec l'activation de la transcription du gène t-bra qui est important pour la différenciation des cellules souches embryonnaires (CSE) [382]. Curieusement, la trimétylation de la CTNNB1 au niveau du même résidu Lys49 par Ezh2 inverse la transcription de la CTNNB1 vers la répression de la différenciation des CSEs [382]. Ces données soulignent que les MPTs au niveau de la Lys49 ont des fonctions biologiques importantes dans la décision de l'activité transcriptionnelle de la CTNNB1.

D'autre part, l'acétylation de la CTNNB1 au niveau de la Lys345 par p300 augmente son activité transcriptionnelle en élevant son affinité avec TCF4 [357]. Le rôle de régulation positive de

l'acétylation de la CTNNB1 par p300 a été supporté par une étude qui démontre que la déacétylase SIRT1 inhibe l'activité transcriptionnelle de la CTNNB1 et la prolifération cellulaire en s'opposant à l'acétylation médiée par p300 [383]. De plus, l'expression de SIRT1 est inversement corrélée avec la CTNNB1 nucléaire dans les spécimens de tumeurs de colon suggérant que la balance dans l'état d'acétylation de la CTNNB1 joue un rôle critique dans les maladies humaines [383].

Finalement, l'acétylation de la CTNNB1 au niveau de la Lys19 et Lys49 par PCAF (p300/CBP-Associated Factor) induit sa stabilisation et sa translocation nucléaire et par conséquent son activité transcriptionnelle [358]. Étant donné que les résidus Lys19 et Lys49 sont aussi importants pour l'ubiquitination médiée par β -TrCP de la CTNNB1 [384], PCAF semble réguler positivement l'activité de CTNNB1 en l'acétylant et en bloquant son ubiquitination dans ces sites [358].

I.2.4 La voie de signalisation WNT/CTNNB1 dans la régulation de l'immunité

Les récentes années ont connu une augmentation considérable d'intérêt vis-à-vis la contribution des ligands WNTs dans la régulation du système immunitaire. Initialement, des immunologistes du développement ont mené des investigations exploratoires décrivant certains ligands WNTs comme des facteurs de croissance pour les thymocytes immatures. Par la suite, ce champs de recherche a connu une grande expansion qu'actuellement la signalisation par les WNTs est décrite comme un régulateur important de l'immuno-hématologie [385]. Ainsi, la signalisation des WNTs est impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques, la

maturation des cellules dendritiques, l'activation et la migration des cellules T périphériques et le développement des leucémies lors d'aberration de la signalisation [386]. La régulation de l'immunité innée par la CTNNB1 est cependant moins explorée, bien que les dernières années aient connu des percées importantes dans ce domaine. Les études récentes ont démontré que l'infection et l'inflammation induites par les bactéries et les virus peuvent influencer directement les fonctions transcriptionnelles de la CTNNB1 [123, 387] [330] [331] [388]. De plus, la CTNNB1 est impliquée dans la pathogénèse des maladies inflammatoires chroniques et le cancer [389].

I.2.4.1 Régulation négative de la réponse immunitaire innée par la voie WNT/CTNNB1 lors d'infections bactériennes

Il a été démontré initialement que l'infection des cellules épithéliales par *Salmonella* active la CTNNB1 en bloquant son ubiquitination et sa dégradation [390]. Par la suite, le même groupe démontre que les mutants constitutivement actifs de la CTNNB1 interagissent avec la sous-unité p50 de NF- κ B, diminuant ainsi sa capacité à lier l'ADN et donc son activité transcriptionnelle qui se traduit par la diminution d'expression d'IL-8. [325]. Ce rapport était le premier à montrer une régulation négative de la voie NF- κ B par la stabilisation spécifique de la CTNNB1, induite par un pathogène. De plus, il s'est avéré que la bactérie *Salmonella* module directement la voie de signalisation pro-inflammatoire de NF- κ B via la protéine AvrA qui fonctionne comme une débubiquitinase. Ainsi, AvrA inhibe la dégradation dépendante de l'ubiquitination des protéines I κ B α (l'inhibiteur cytoplasmique de NF- κ B) et CTNNB1, il en résulte une régulation négative de la réponse inflammatoire [391]. Le même laboratoire a démontré par la suite que l'infection par

la *Salmonella* induit l'expression de WNT2 et WNT11. Il en résulte la diminution de l'expression de l'IL-8 et donc de la réponse inflammatoire [392, 393]. Ces données soulignent que certains ligands WNTs jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie intestinale et dans la défense innée de l'hôte.

Une autre étude a exploré l'effet de l'interaction CTNNB1/NF- κ B dans la régulation de l'inflammation causée par *Shigella dysenteriae* (*S.dysenteriae*) [394]. Les auteurs ont trouvé que l'infection par *S.dysenteriae* augmente l'activité kinase de GSK3 β , favorisant ainsi la dégradation de la CTNNB1. Il en résulte la diminution de l'interaction CTNNB1/NF- κ B et l'induction d'une inflammation intestinale accrue. Ainsi la CTNNB1 régule négativement l'activité de NF- κ B induite par *Shigella*, ce qui augmente la production des cytokines pro-inflammatoires comme IL8 [394].

Mycobacterium tuberculosis peut également interférer avec les composants de la voie WNT/CTNNB1 en augmentant l'expression de FZD1 d'une façon dépendante de TLRs, de MYD88 et de la signalisation NF- κ B [395]. La présence de WNT3A, qui est un ligand de FZD1, dans les poumons de souris infectées avec *M.tuberculosis* réduit la capacité des macrophages à produire TNF α en augmentant l'activité transcriptionnelle de la CTNNB1. Les auteurs ont proposé alors que l'induction de l'expression de FZD1 constitue un mécanisme à travers lequel WNT3A réprime l'inflammation, entraînant une boucle de rétro-contrôle négatif de l'inflammation dans les macrophages de souris durant le processus d'infection par *M.tuberculosis* [395].

I.2.4.2 Régulation de l'immunité innée par la voie WNT/CTNNB1 suite à une infection virale

Contrairement aux infections bactériennes, les études menées sur les infections virales ont rapporté des mécanismes plus complexes de la régulation de la CTNNB1. Le nombre restreint des études et la divergence des types cellulaires et des expérimentations utilisées ne permettent pas encore d'avoir une image consensuelle sur cette régulation. Toutefois, les principales observations suggèrent la CTNNB1 comme une composante de la régulation positive de la transcription des interférons de type I. Cette action n'a pas été liée à l'expression ou sécrétion de ligands WNTs particuliers, on rapporte plutôt que la CTNNB1 subit directement des MPTs spécifiques qui la dirigent vers la modulation transcriptionnelle de la réponse antivirale médiée principalement par IRF3 (**Tableau 4**).

Virus/ Stimulation	Type cellulaire	La cible activée	Type de régulation sur l'IFNB1	Mécanisme d'action	Références
VSV	Macrophages murins	LRRFIP1	Positif	Le PRR cytosolique LRRFIP1 interagit avec la CTNNB1 et induit la phosphorylation Ser552. La CTNNB1 interagit ensuite avec IRF3 et recrute p300 sur le promoteur d'IFNB1 pour activer la transcription	[123]
HSV-1 Poly I:C	Macrophages murins	AKT	Positif	Induit la phosphorylation de la CTNNB1 au niveau de Ser552, ce qui contribue à l'augmentation de la transcription d'IFNB1	[375]
VS, VSV	Cellules humaines épithéliales (HEK293T HT1080) <i>In vivo</i> (souris)	PKC et HDAC6	Positif	La déacétylation de la CTNNB1 au niveau de Lys49 est requise pour l'interaction d'IRF3 avec ses co-activateurs CBP/p300 et l'induction de la transcription d'IFNB1 et d'ISGs.	[330, 396]

VS, VSV	HEK293T et les cellules du CCR, (HCT116, DLD1, colo205, SW620)	CTNNB1	Négatif	La CTNNB1 régule négativement l'immunité antivirale dans les cellules du CCRs en bloquant la translocation nucléaire d'IRF3	[397]
VS	Cellules humaines épithéliales (HEK293T, HeLa, HEC-1B) Fibroblastes primaires humaine (MRC-5) Cellules souches murines embryonnaire s (ES) et des fibroblastes murins embryonnaire s (MEFs)	GSK3 α/β	-Positif avec la forme de la CTNNB1 phosphorylée par GSK3 -Négatif avec la forme non phosphorylée par GSK3	GSK3 α/β phosphoryle la CTNNB1 au niveau de S33/S37/T41 ce qui promovoit l'activité transcriptionnelle d'IRF3. L'inhibition de GSK3 α/β résulte en la déphosphorylation de la CTNNB1 et ainsi la diminution du recrutement d'IRF3 sur le promoteur d'ISG56.	[331]

VSV, poly I:C	MEF, HEK293	GSK3 β	Positif	Indépendamment de son activité kinase, GSK3 β régule l'activation d'IRF3 en promouvant l'activation de TBK1.	[64]
LiCl RVFV	Cellules murines (fibroblasts L929 et hépatocytes AML12). <i>In vivo</i>	GSK3 β	Négatif	L'inhibition de GSK3 par le LiCl augmente les niveaux constitutifs de l'IFNB1 à travers le recrutement du complexe TCF/CTNNB1 sur le promoteur d'IFNB1.	[388]

Tableau I.4 : La régulation de l'immunité innée anti-virale par la CTNNB1

Une première étude a décrit un rôle transcriptionnel de la CTNNB1 sur le promoteur de l'IFNB1 lors de l'infection par la bactérie *Listeria monocytogenes* et par VSV dans les macrophages de souris [123]. Ainsi, le senseur cytoplasmique des acides nucléiques LRRFIP1 interagit avec la CTNNB1 lors de l'infection et induit sa phosphorylation au niveau de la Ser552. La CTNNB1, activée sur le plan transcriptionnel, peut se positionner au niveau de l'enhancéosome de l'IFNB1, interagir avec IRF3 et recruter le co-activateur transcriptionnel p300 afin de permettre l'hyperacétylation du promoteur et induire la transcription d'IFNB1 [123]. Un rapport subséquent a démontré qu'AKT est responsable de la phosphorylation de la CTNNB1 au niveau de la Ser552 suite à l'infection virale [375].

Une autre étude a identifié que l'infection par SeV active PKC α , entraînant séquentiellement la phosphorylation de HDAC6 et la déacétylation de la CTNNB1 [330] [330]. Il en résulte la translocation nucléaire de la CTNNB1 et l'interaction avec IRF3 pour se lier sur ses promoteurs respectifs afin d'activer la transcription de gènes d'IFNB1 et d'ISG [330]. Une autre étude a confirmé que HDAC6 est une composante importante de l'immunité innée antimicrobienne *in vivo* et *in vitro* [396]. Le mécanisme suggéré est que la phosphorylation de CBP par PKC β et la déacétylation de la CTNNB1 par HDAC6 sont requis pour l'activation de l'activité transcriptionnelle d'IRF3 suite à la stimulation de RIG-I, TLR3 et TLR4 [396]. Toutefois, plus récemment, une étude rapporte que l'effet important de HDAC6 dans la régulation de la réponse anti-virale médiée par RIG-I, découle principalement de la déacétylation de RIG-I par HDAC6 qui résulte en l'activation de RIG-I et de la signalisation en aval. Dans ce cas, la déacétylation de la CTNNB1 par HDAC6 a été proposée comme contribuant partiellement à l'importance de HDAC6 dans la régulation de la transcription d'IFNB1 [59]. Plus récemment, une étude a démontré que la CTNNB1 régule négativement la signalisation RLR dans les cellules du cancer de colon (CCR) en empêchant la translocation nucléaire d'IRF3 [397].

Il est important de noter qu'à part la CTNNB1, d'autres composants de la voie WNT/CTNNB1 ont été directement impliqués dans la régulation de l'immunité antivirale. L'exemple le plus étudié est celui de GSK3 α/β . Initialement, un rôle de GSK3 a été décrit dans la production des cytokines pro ou anti-inflammatoires suite à l'induction de la signalisation des TLRs par des agonistes [398]. Ainsi, le silençage de GSK3 ou le traitement avec des inhibiteurs de son activité dans les monocytes humains et les PBMCs augmentent la production d'IL-10 après la

stimulation des TLRs, la production concomitante de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12 and IFN- γ est par contre réduite. Le mécanisme proposé est que GSK3 affecte de manière différente l'association de p65 et CREB (cAMP response element—binding protein) avec le co-activateur CBP au niveau des promoteurs de ces gènes. Ces résultats ont conféré à GSK3 une fonction critique dans la modulation de la production des cytokines pro-versus anti-inflammatoires [398]. Par la suite, une autre étude dans les macrophages murins a démontré que GSK3 β régule négativement la production d'IFN- β médiée par la stimulation de TLR4 à travers la régulation de l'expression de C-JUN [399]. Ce n'est qu'en 2010 qu'une étude a rapporté un rôle direct de GSK3 β dans la régulation de la réponse antivirale innée [64]. Ainsi, la surexpression de GSK3 β augmente l'activation d'IRF3, de NF- κ B, l'induction d'IFN- β et la réponse cellulaire antivirale. À l'inverse, la réduction ou la délétion de son expression réduit considérablement les mêmes événements cellulaires antiviraux [64]. Plus intéressant, ces actions de GSK3 β semblent être indépendantes de son activité enzymatique. En effet, les auteurs ont établi une association entre GSK3 β et TBK1 qui est dépendante de l'infection virale. Ainsi, GSK3 β induit l'auto-association de TBK1 et son autophosphorylation aux résidus Ser172; qui est critique pour l'activation d'IRF3 et l'induction d'IFN- β [64]. Toujours sur la voie RLR, une autre étude rapporte que GSK3 α/β régulent négativement l'activité d'IRF3 en la phosphorylant directement dans la région de liaison à l'ADN, entraînant l'atténuation de son association avec les séquences cibles d'ADN [400]. Les auteurs ont suggéré que cette régulation se fait en absence d'une infection virale afin de supprimer une activation basale d'IRF3 et contribue à amplifier son activation lors de la présence du pathogène. Cette régulation peut aussi se

manifester au cours du stage terminal de l'infection afin de moduler l'activité transcriptionnelle d'IRF3 [400]. Ces rapports bien que parfois contradictoires, suggèrent que GSK3 régule la production d'IFN- β à travers plusieurs voies. Toutefois, comme la CTNNB1 est un substrat clé de GSK3, ces résultats soulèvent la question sur le lien de GSK3 dans la régulation des fonctions de la CTNNB1 dans la réponse antivirale innée.

En appui avec ce constat, une étude a permis d'établir un rôle direct des deux isoformes (α et β) de GSK3 dans la régulation de la réponse cellulaire antivirale à travers la phosphorylation de la CTNNB1 [331]. En effet, l'étude décrit que l'activation de GSK3 durant l'infection virale engendre l'augmentation de la phosphorylation de CTNNB1 aux résidus S33/S37/T41 et le recrutement de phospho-CTNNB1 au niveau d'IRF3 pour agir en tant que co-activateur aux promoteurs sur lesquels elle s'associe [331]. En résumé, cette étude rajoute que le rôle précédemment décrit de la CTNNB1 en tant que co-activateur transcriptionnel de l'expression de gènes antiviraux est réalisé par la forme phosphorylée de la CTNNB1, qui par un mécanisme non déterminé s'échappe à la dégradation par le complexe de destruction.

Par ailleurs, un rapport plus récent expose un mode différent de régulation de l'immunité antivirale innée par la CTNNB1 dans des cellules murines [388]. Les auteurs démontrent que le traitement des cellules par l'inhibiteur de GSK-3 LiCl entraîne l'augmentation de l'expression constitutive et du gène d'IFN- β , indépendamment des facteurs IRF3-NF- κ B-ATF2/C-JUN. Cet effet du LiCl corrèle par contre avec le recrutement de la CTNNB1 au niveau du promoteur d'IFN- β et requiert un site de liaison des facteurs TCF positionnés au niveau 5' de la région VRE (Virus-Responsive Element, où se lie IRF3-NF- κ B-ATF2/ C-JUN). Il en résulte que la capacité

du LiCl à induire l'expression d'IFN- β est accomplie via un complexe TCF/CTNNB1. Pour appuyer un rôle immunomodulateur de complexe TCF/CTNNB1, les auteurs ont montré que la pathogénicité de virus RVFV (Rift Valley Fever Virus) corrèle avec le ciblage de la formation d'un complexe transcriptionnel actif TCF/CTNNB1.

I.2.4.3 Les virus qui interfèrent avec la voie WNT/CTNNB1

Plusieurs études ont démontré que certains virus activent la signalisation WNT/CTNNB1 pour permettre un environnement propice à leur réplication. Ces études ont fourni des preuves convaincantes sur le rôle de l'activation -induite par l'infection virale- de la signalisation WNT/CTNNB1 dans la régulation du cycle et prolifération cellulaire, de l'apoptose, des mécanismes de l'EMT etc [401]. Comme les dérégulations de la signalisation WNT/CTNNB1 sont largement impliquées dans le développement de cancers, il n'est pas surprenant que les premières investigations sur la contribution de cette signalisation dans la pathogenèse virale, se sont concentrées sur les virus oncogéniques [401].

Toutefois, les propriétés de l'augmentation de l'activité de la voie WNT/CTNNB1 dans la modulation des réponses inflammatoires lors d'une infection virale, demeurent encore très peu explorées.

Dans cette section, nous allons décrire quelques exemples de mécanismes à travers lesquels des virus oncogéniques interfèrent et activent la signalisation WNT/CTNNB1 (**Tableau 5**). Nous allons également rapporter les études et les observations qui soulignent le rôle de l'activation de la signalisation WNT/CTNNB1 dans la modulation de l'inflammation induite par l'infection virale.

I.2.4.3.1 Les effets des protéines virales oncogéniques sur la signalisation WNT/CTNNB1

I.2.4.3.1.1 le VHC

L'infection par le VHC est un problème de santé mondiale car, selon le rapport de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), environ 3% de la population mondiale est infectée par le VHC et 170 millions de personnes deviennent des porteurs chroniques [402]. Le VHC provoque une inflammation chronique du foie, qui déclenche plusieurs changements, notamment la production de stress oxydatif, la fibrose progressive, la cirrhose et enfin le CHC [402]. Plusieurs évidences indiquent que les protéines du VHC provoquent l'activation de la voie de signalisation WNT/CTNNB1, et les preuves d'un rôle de la signalisation WNT/CTNNB1 dans l'apparition et la progression du CHC sont concluantes [403].

Il a été démontré que l'infection par le VHC active la signalisation WNT/CTNNB1 à travers différents mécanismes (**Tableau 4**). Parmi lesquels on note l'activation d'AKT qui induit la phosphorylation Ser552 de la CTNNB1, il en résulte la diminution de son ancrage au niveau des jonctions d'adhérence et l'activation de son activité transcriptionnelle. Cette activation entraîne la transcription des gènes marqueurs de la TEM comme SNAIL et TWIST qui induisent la progression des maladies du foie associées à l'infection par le VHC [404]. Toutefois, cet effet ne faisait pas intervenir des ligands WNTs [404]. Des études subséquentes ont permis de révéler des interactions directes entre les protéines de VHC et la voie WNT/CTNNB1. Initialement, il a été démontré que la protéine NS5A et la polyprotéine entière de HCV sont responsables de l'augmentation du taux de la CTNNB1 (accumulation et stabilisation de la protéine, dégradation

réduite par le protéasome) dans les cellules exprimant le génome du VHC. Les mécanismes associés se résument dans l'activation de la signalisation PI3K/AKT qui entraîne la phosphorylation de GSK3 β causant son inactivation et puis la stabilisation de la CTNNB1. Les niveaux élevés de la CTNNB1 activent des gènes qui facilitent la transformation néoplasique des hépatocytes infectés par le VHC [405]. L'implication de la protéine NS5A dans l'activation de la voie de signalisation WNT/CTNNB1 a été confirmée dans des études ultérieures [406], illustrant l'interaction de NS5A avec la CTNNB1 et la co-localisation des deux protéines dans les cellules HepG2. Ces résultats soulignent que NS5A peut stabiliser directement la CTNNB1 indépendamment des effets de NS5A sur AKT et GSK3 β [407]. Le mécanisme d'accumulation de la CTNNB1 par inactivation de GSK-3 β a été également confirmé [406]. NS5A peut également activer la transcription CTNNB1-dépendante de l'oncogène C-MYC [408].

La protéine structurale core du VHC induit également plusieurs événements moléculaires qui augmentent la signalisation WNT/CTNNB1. Core sert de régulateur de la transcription qui favorise la signalisation WNT/CTNNB1 dans les hépatocytes. Ceci est provoqué par l'augmentation de l'expression des ligands WNTs (WNT-2, -3, -3a, -10A, -10B), des récepteurs FZDs (FZD-1, -2, -3, -6, -7, -9) et des co-récepteurs LRP5/6 [409-411] tout en inhibant la transcription des antagonistes de la signalisation WNT/CTNNB1 comme SFRP2 (Secreted FZD-Related Protein 2 et DKK1 (dickkopf 1) [412]. Ce dernier effet est médié par le silençage épigénétique des promoteurs impliquant le recrutement core-dépendant d'une méthyltransférase d'ADN et de HDAC 1[412, 413]. De plus, core assure l'hyperméthylation du promoteur gène E-

Cadherin (CDH1) ce qui indirectement augmente l'activité de la CTNNB1 qui devient moins séquestrée dans les jonctions d'adhérence [414].

I.2.4.3.1.2 Le VHB

La prévalence mondiale de l'infection chronique par le VHB se situe entre 240 et 350 millions d'individus. Comme le VHC, l'infection par le VHB peut avoir des conséquences cliniques dangereuses telles que la fibrose, la cirrhose et le CHC [415]. Plusieurs liens entre le VHB et la signalisation WNT/CTNNB1 ont été établis. L'une des protéines les plus importantes du VHB est l'HBx, considérée comme une oncoprotéine en raison de ses caractéristiques cancérogènes [416]. Des études *in vitro* ont montré que HBx régule positivement la signalisation WNT/CTNNB1. Un modèle de souris HBx transgéniques a démontré l'augmentation de la CTNNB1 nucléaire et l'expression accrue de ces gènes cibles comme MYC et Cyclin D1 [417]. Un mécanisme potentiel peut être via la liaison directe de la protéine HBx avec APC [418], ou la séquestration de la déacétylase SIRT1 [419], l'interaction de HBx avec les deux protéines protège la CTNNB1 de la dégradation. Un autre mécanisme par lequel HBx régule la signalisation WNT est la modulation épigénétique de l'expression des protéines antagonistes de la signalisation WNT/CTNNB1. Ainsi, il a été démontré que HBx est associée à une hyperméthylation des promoteurs SFRP1 et de SFRP5 dans des tissus de patients atteints de CHC positifs au VHB, ce qui entraîne l'augmentation de la signalisation WNT/CTNNB1 [420].

I.2.4.3.1.3 Autres Virus

La signalisation WNT/CTNNB1 est activée par d'autres virus comme le VPH (Virus du Papillome Humain) [421-423], le VEB (virus Epstein Barr) [379, 424, 425] , le KSHV (Kaposi Sarcoma HerpesVirus) [426, 427] (**Tableau 5**). Cette liste n'est pas exhaustive car plusieurs familles de virus activent également la signalisation WNT/CTNNB1 comme le VIH[428-430], l'influenza [431, 432], RVFV (Rift Valley fever virus) [433] et vaccinia [434]. En résumé, les virus qui interagissent avec la signalisation WNT/CTNNB1 agissent via des mécanismes très communs tels que la modulation de l'accumulation cytoplasmique et nucléaire de la CTNNB1 par des MPTs ou par le ciblage direct et indirect des protéines de la voie WNT, des modifications épigénétiques des gènes codant pour les protéines de la voie WNT, notamment les ligands WNTs et les récepteurs FZDs, la désactivation des protéines SFRP (antagonistes de la signalisation WNT), la prévention de la dégradation de la CTNNB1 par le protéasome via l'interaction avec les protéines du complexe de destruction telles que GSK3 β et APC et l'induction ou l'expression de microARNs viraux ou cellulaires qui ciblent les protéines de la voie WNT.

Virus	La protéine virale impliquée	Le mécanisme moléculaire	Références
VHC	Core	<p>-Stabilise la CTNNB1 à travers l'inactivation de GSK3β, il en résulte l'augmentation de l'expression des gènes cibles de la CTNNB1 comme c-MYC et Cyclin D ce qui promouvoit la prolifération et la croissance tumorale. L'effet est observé suite à la co-expression de core et du ligand WNT3A.</p> <p>-Au niveau nucléaire, Core régule la transcription des hépatocytes en facilitant la signalisation WNT à travers la surexpression des ligands WNT de FZDs et de LRP5/6 ou à travers l'inhibition de l'expression des antagonistes de la signalisation WNT comme SFRP1 et DKK1.</p> <p>-Réduit l'expression de la E-cadherine ce qui diminue la séquestration de la CTNNB1 au niveau membranaire</p>	[409-414]
	NS5A	<p>-Active PI3K qui à son tour active AKT qui assure l'inactivation de GSK3β, et ainsi la stabilisation de la CTNNB1 et la stimulation subséquente de son activité transcriptionnelle.</p> <p>-Se lie à la CTNNB1 ce qui la stabilise directement d'une façon qui paraît indépendante de ses effets sur AKT et GSK3β.</p>	[405-407]

VEB	LMP1	-Inhibe l'expression de SIAH1 dans les cellules de lymphome B augmentant ainsi les niveaux de la CTNNB1.	[379]
		-Augmente l'accumulation nucléaire de la CTNNB1 et son activité transcriptionnelle dans les cellules du cancer du nasopharynx.	[424]
		-Induit la dysplasie des cellules épithéliale in vivo à travers la stabilisation de la CTNNB1.	[425]
	LMP2	-Augmente les niveaux de la CTNNB1, sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle.	[435]
		-Induit la méthylation des promoteurs des protéines de la signalisation WNT (WNT2, WNT 3, WNT 11, SFRP4, SFRP5, Axin1, FZD9 ...) dans les cellules du cancer gastrique.	[436]
		- Augmente l'expression des microARNs viraux qui ciblent les protéines des inhibiteurs de la signalisation WNT comme APC.	[437]
HBV	HBx	-Augmente les niveaux de la CTNNB1 en se liant à ses régulateurs négatifs comme APC et SIRT1. -Inhibition de l'expression des antagonistes de la voie WNT/CTNNB1 SFRP1 et SFRP5 à travers la méthylation de leurs promoteurs.	[418, 419] [420]
	HBc et autres protéines	-Augmente l'expression des gènes LEF-1, Cyclin D1 et MYC	[438, 439]

KSHV	LANA	-Stabilise la CTNNB1 en interagissant avec GSK3 β .	[426]
	vGPCR	-Augmente l'activité transcritionnelle de la CTNNB1 active au niveau nucléaire	[427]
VPH	E6 et E7	-induit la signalisation WNT/CTNNB1 et la transcription médiée par CTNNB1-TCF-LEF des proto-oncogènes MYC et CYCLIN D1. -Dysrégulation de la voie Wnt via la modulation des gènes MYC, FZD, DKK et WNT16.	[421, 422] [423]

Tableau I.5: les effets des protéines virales sur la signalisation WNT/CTNNB1

I.2.4.3.1.4 Outre l'effet oncogénique, l'intérêt d'activer la signalisation WNT/CTNNB1 suite à une infection virale :

Jusqu'à présent, plusieurs études suggèrent que la signalisation WNT/CTNNB1 jouent un rôle immuno-modulateur important [389]. Plus précisément, la plupart des preuves soulignent que l'activation de la signalisation WNT/CTNNB1 corrèle avec la régulation négative de la production des cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α , dans différents types cellulaires activés par différents stimuli, tels que le LPS, les cytokines, les bactéries et certains virus [323-329, 440-442]. De plus, le rôle anti-inflammatoire de la signalisation WNT/CTNNB1 dans le foie a été démontré *in vivo* chez des souris, où la CTNNB1 fournit un rétro-contrôle négatif de la régulation de TLR4 afin d'inhiber l'activité de NF- κ B/IRF3 et, finalement, de supprimer les gènes pro-inflammatoires [442]. Ces données mènent à deux constats qui pourraient expliquer l'intérêt viral ou cellulaire d'activer la signalisation WNT/CTNNB1 suite à une infection virale : i- La majorité des virus mentionnés ci-dessus causent des infections chroniques en modulant les réponses inflammatoires. Ainsi, la modulation

négative des réponses inflammatoires par une signalisation augmentée de WNT/CTNNB1 pourrait fournir une pression de sélection supplémentaire pour que les virus acquièrent des propriétés d'activation de la signalisation WNT/CTNNB1. Ce mécanisme s'inscrira dans le cadre de subversion virale au système immunitaire qui favorise la réplication virale surtout dans les phases initiales de l'infection. ii- le 2^{ème} constat est que la signalisation WNT/CTNNB1, régule l'inflammation cellulaire intrinsèque induite par l'infection virale et constitue ainsi, un système de modulation des réponses inflammatoires.

La question sur comment les virus utiliseraient la signalisation WNT/CTNNB1 pour subvenir au système immunitaire est pour l'instant obscure et nécessite d'autres investigations. Toutefois, les données actuelles pointent plus vers le 2^{ème} constat où la signalisation WNT/CTNNB1 représente une composante cellulaire intrinsèque de la régulation immunitaire.

La régulation des processus inflammatoires lors des infections virales par la signalisation WNT/CTNNB1 découlerait probablement de l'interaction de la CTNNB1 avec différents facteurs de transcription comme NF- κ B [321], PPAR γ [443, 444], FOXO [311, 445, 446], VDR (Vitamin D Receptor) [447, 448], IRF3 [123, 330, 331] et IRF8 [449] qui sont tous des régulateurs connus des réponses inflammatoires. Par conséquent, des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer le rôle de la CTNNB1 dans la régulation de ces facteurs de transcription et l'expression de leurs gènes cibles en réponse à l'inflammation causée par l'infection virale.

I.3 Problématique de recherche et objectifs du projet de thèse:

La découverte de nouveaux régulateurs des voies de signalisation de l'immunité antivirale connaît actuellement une percée sans précédent. Les régulateurs identifiés illustrent des réseaux moléculaires très délicats reflétant la complexité de cette régulation et suggérant l'existence d'autres régulateurs importants à découvrir.

D'autre part, les dernières années ont connu une augmentation de l'incidence d'infection de virus à ARN émergents et ré-émergents comme le virus du Nilot (West Nile Virus) [450], DENV [451] et EBOV (EBOla virus) [452] posant d'importants problèmes de santé publique mondiale. L'utilisation de médicaments antiviraux DAAs (Direct-Acting Antivirals) interférant directement avec le cycle de vie des virus a donné des résultats prometteurs comme dans le cas de VHC. Toutefois la grande pression de sélection sur les gènes viraux exercée par les DAAs favorise naturellement l'évasion virale par des mutations de résistance posant ainsi un problème pour leur utilisation à long terme.

Ainsi, nous sommes confrontés actuellement à de sérieux défis vis-à-vis la proposition de nouvelles stratégies thérapeutiques qui n'interfèrent pas directement avec le virus. Pour cela, notre laboratoire s'est intéressé à l'identification de nouveaux régulateurs de la voie RLR, spécifiquement suite à l'infection par le virus à ARN Sendai, en partant de l'hypothèse que le meilleur moyen de traiter l'infection virale est directement la modulation de la réponse antivirale de l'hôte. Par exemple, en ciblant l'action d'un nouveau immuno-modulateur via l'inhibition pharmacologique d'un régulateur négatif ou la stabilisation d'un régulateur positif. L'approche générale de notre laboratoire aspire à la réalisation des objectifs suivants:

1-la découverte de nouveaux régulateurs de l'immunité antivirale innée en réalisant un criblage génomique évaluant l'effet de la suppression par ARNi de plus que 15000 gènes sur l'activité transcriptionnelle d'IFNB1. 2- la validation fonctionnelle des régulateurs identifiés et la caractérisation de leurs mécanismes d'action et des voies de signalisation impliquées. 3- l'évaluation de leurs rôles dans l'infection et la réplication d'autres virus à ARN comme le VHC et l'Influenza A. 4- l'évaluation de la viabilité de l'approche antivirale via l'identification de composés chimiques qui régulent l'immunité antivirale, ainsi que la caractérisation de leur effet antiviral sur la réplication de plusieurs virus à ARN. Un criblage chimique à haut débit sera utilisé pour réaliser cet objectif et l'analyse croisée avec les résultats du criblage génomique permettra de faire correspondre les cibles cellulaires potentielles avec les composés inhibiteurs sélectionnés.

Le criblage primaire a permis l'identification de plusieurs centaines de régulateurs de la signalisation RLR. Les deux ligands WNT2B et WNT9B font partie de la collection de gènes candidats identifiés comme des régulateurs négatifs de l'expression d'IFNB1. Ainsi, les objectifs spécifiques de mon projet de doctorat consistent en :

1-La validation du rôle de WNT2B et WNT9B dans la régulation de l'immunité anti-virale innée médiée par les RLRs.

2-La caractérisation moléculaire de la fonction de la CTNNB1 dans la régulation négative de l'immunité anti-virale médiée par les RLRs.

Chapitre II

II. Genome-wide RNAi Screen Reveals a New Role of a WNT/CTNNB1 Signaling Pathway as Negative Regulator of Virus-induced Innate Immune Responses

Martin Baril^{1*}, Salwa Es-Saad^{1*}, Laurent Chatel-Chaix¹, Karin Fink⁴, Tram Pham⁵, Valérie-Ann Raymond⁴, Karine Audette¹, Anne-Sophie Guenier¹, Jean Duchaine¹, Marc Servant³, Marc Bilodeau^{2,4}, Éric Cohen⁵, Nathalie Grandvaux^{2,4} and Daniel Lamarre^{1,2,4}.

Short title: Regulation of antiviral responses by WNT signaling

*These authors contributed equally to the work.

¹Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC), ²Faculté de Médecine, ³Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. ⁴Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), Hôpital Saint-Luc, Montréal, Québec, Canada. ⁵Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), 110 avenue des Pins ouest, Montréal, Québec, Canada

Corresponding author: Daniel Lamarre, PhD

Mailing address:

Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC),

Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal (Québec), H3C 3J7, CANADA

Phone: +1-514-343-7127

Fax: +1-514-343-7780

Email: daniel.lamarre@umontreal.ca

II.1 Abstract

To identify new regulators of antiviral innate immunity, we completed the first genome-wide gene silencing screen assessing the transcriptional response at the interferon- α (*IFNB1*) promoter following Sendai virus (SeV) infection. We now report a novel link between WNT signaling pathway and the modulation of retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor (RLR)-dependent innate immune responses. Here we show that secretion of WNT2B and WNT9B, and stabilization of β -catenin (CTNNB1), upon virus infection negatively regulate expression of representative inducible genes *IFNB1*, *IFIT1* and *TNF* in a CTNNB1-dependent effector mechanism. The antiviral response is drastically reduced by glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitors but restored in CTNNB1 knockdown cells. The findings confirm a novel regulation of antiviral innate immunity by a canonical-like WNT/CTNNB1 signaling pathway. The study identifies novel avenues for broad-spectrum antiviral targets and preventing immune-mediated diseases upon viral infection.

II.1.1 Author Summary

The innate immune system is the first line of defense for organisms that possess an adaptive immune system. It allows a rapid immune response upon viral infections, in addition to propagate an antiviral state in neighboring cells. In an attempt to identify new regulators of antiviral innate immunity, we completed the first genome-wide gene knockdown screen, consisting of individually silencing the expression of 15,000 genes in virus-infected human cells. We discover 114 validated genes that regulate type I interferon antiviral response. Among these genes, two members of the WNT family, WNT2B and WNT9B, were shown to negatively regulate the antiviral innate response. The infection results in secretion of the WNT ligands, stabilization of β -catenin through and in its translocation to the nucleus. The WNT

signaling pathway regulates the antiviral innate response in a negative feedback mechanism. Our data showed that inhibition of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) that targets the canonical WNT pathway blocks the antiviral innate response. Altogether this suggests that drugs targeting the WNT pathway may be therapeutically useful for modulating viral infection or virus-induced inflammation.

II.2 Introduction

The innate immune system is the first line of defense for organisms that possess an adaptive immune system. It relies on the presence of specific pattern recognition receptors (PRRs) that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) to induce expression of cytokines such as type I interferons (IFNs), pro-inflammatory cytokines and chemokines. Through the induction of IFN-stimulated genes (ISGs) upon viral infection, type I IFNs are critical components of the innate immune response in virtually all cells and the target of viral immune evasion strategies. Upon viral infection, recognition of foreign nucleic acids is made through extracellular sensing by endosomal Toll-Like Receptors (TLRs 3, 7, 8 and 9) or intracellular detection by specific DExD-box RNA helicases: retinoic acid-inducible gene I (RIG-I also known as DDX58), melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA5, also known as IFIH1) and laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2, also known as DHX58), which form the RIG-I-like receptors (RLRs) family [54]. In response to viral infection, these RLRs associate with the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adaptor (also named IPS-1, Cardif and VISA) [453-456], leading to the activation of key transcriptional factors such as interferon regulatory factor 3 (IRF3) and nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells (NF- κ B), induction of type I IFN, and ultimately production of hundreds of ISGs. This antiviral effector program is a fundamental target for virus-encoded immune

suppression [457]. An outstanding example is the hepatitis C virus (HCV) NS3/4A protease that cleaves TRIF and MAVS adaptor molecules in the TLR3 and RLR pathways, respectively, to block IRF3-dependent expression of IFNB1 and IFN-mediated cellular antiviral response [458]. Therefore, regulation of *IFNB1* gene expression is important for efficient antiviral response, but is also required to prevent negative effects of an extended duration of type I IFN production [145]. Two previous RNAi screens focused on regulation of innate immunity, but were both performed in drosophila following bacterial infection [459, 460]. In an effort to identify regulators of the innate antiviral response in human, we completed the first genome-wide RNAi screen assessing SeV-induced *IFNB1* transcription in embryonic kidney HEK 293T cells. We identified 237 potential modulator genes for which negative or positive actions of gene products were mapped to the different steps of the antiviral responses from virus sensing, signal propagation/amplification up to the feedback regulation. In the present study, we described specific WNT ligands activating a canonical-like WNT/CTNNB1 pathway as a previously unrecognized effector mechanism to negatively regulate antiviral innate immunity.

II.3 Results

II.3.1 Genome-wide RNAi screen identify modulators of SeV-induced *IFNB1* expression

The individually arrayed lentiviral-based short hairpin RNA (shRNA) human library (Mission TRC-Hs1.0 from Sigma-Aldrich) produced in-house was used to knockdown the expression of ~15,000 human genes by RNA interference (RNAi) combining 3 shRNAs per gene. HEK 293T cells stably expressing the firefly luciferase gene under the control of the *IFNB1* promoter was used to monitor type I IFN expression in response to SeV infection (**Figure II.1A**). A robust 100-fold increase in luminescence was obtained upon infection and the cell

assay was used to screen the shRNA human library by silencing one gene per well in 96-well plate format (**Figure II.S1**). The primary genome-wide screen was performed with control shRNAs on each plate targeting the positive regulator (PR) MAVS gene, which produced a tenfold decrease in luminescence, and the negative regulator (NR) NLR family member X1 (NLRX1) gene [90], which increased the luminescence by approximately twofold (**Figure II.S1A**). As control, the transduction of cells with non target sequence (NT) shRNA-expressing lentiviral particles was evaluated on SeV-induced *IFNBI* promoter activity three days post-transduction. Similar inductions in luciferase and mRNA levels were detected in control transduced cells compared to non-transduced cells demonstrating that infection of cells with shRNA-expressing lentivirus is not contributing to the SeV-mediated antiviral responses. Following statistical analyses of the data using the strictly standardized mean difference (SSMD) as a cutoff [461], we selected 292 potential PR whose silencing significantly decreased the *IFNBI* reporter activity ($\text{SSMD} \leq -1.314$, approximately ≥ 2 SDs from the plate median) and 289 NR whose silencing significantly increased the *IFNBI* reporter activity ($\text{SSMD} \geq 1.662$, approximately ≥ 2.5 SDs from the plate median). For the 581 gene hits, we produced five independent shRNA-expressing lentiviruses that were tested individually in confirmation and secondary screens (**Figure II.1B**). These secondary assays relied on the activation of the RLR pathway at different landmarks of the signaling cascade, through transfection of polyI:C (dsRNA mimetic) to activate RIG-I directly, overexpression of MAVS leading to its constitutive activation, and overexpression of IRF3(5D), a phosphomimetic mutant of IRF3 constitutively targeted to the nucleus, to activate transcription at the *IFNBI* promoter (**Figure II.1C**). The inhibition profile of each shRNA in secondary screens allowed to classify gene hits within the RLR signaling cascade in four functional groups: I - SeV

specific, II - cytoplasmic dsRNA sensing, III - MAVS-dependent signaling, IV - nuclear import or transcription factor-dependent process (**Figure II.1D** for validation of secondary assays with control genes). Secondary screening resulted in the identification of 237 gene hits (132 PR and 105 NR) that modulate specifically the reporter activity at the *IFNBI* promoter without affecting reporter expression from a nonimmune-related endogenous elongation factor 1 alpha (EF1 α , also known as EEF1A1) promoter (**Figures II.1B** and **II.1C**). Further prioritizing studies included the transcriptional modulation of virus-induced endogenous *IFNBI* mRNA synthesis with at least two shRNAs, which emphasized 114 gene hits, 80 PR and 34 NR (**Figures II.1E, 1F** and **II.S2**). Finally, qRT-PCR validation showed a knockdown efficiency of greater than 40 % (median knockdown efficiency of 70 %) with two independent shRNAs for 59 gene prioritized gene hits (**Figure II.1F** and see **Table II.S1** for the complete set of primary, secondary and qRT-PCR data). The reliability of the screening approach was confirmed by detection of 10 out of the 114 gene hits (9.6 %) previously associated to innate immunity, including the signaling components RIG-I (PR group II), MAVS (PR group III), IRF3 (PR group IV) and the NF- κ B subunits REL and RELA (both PR group IV).

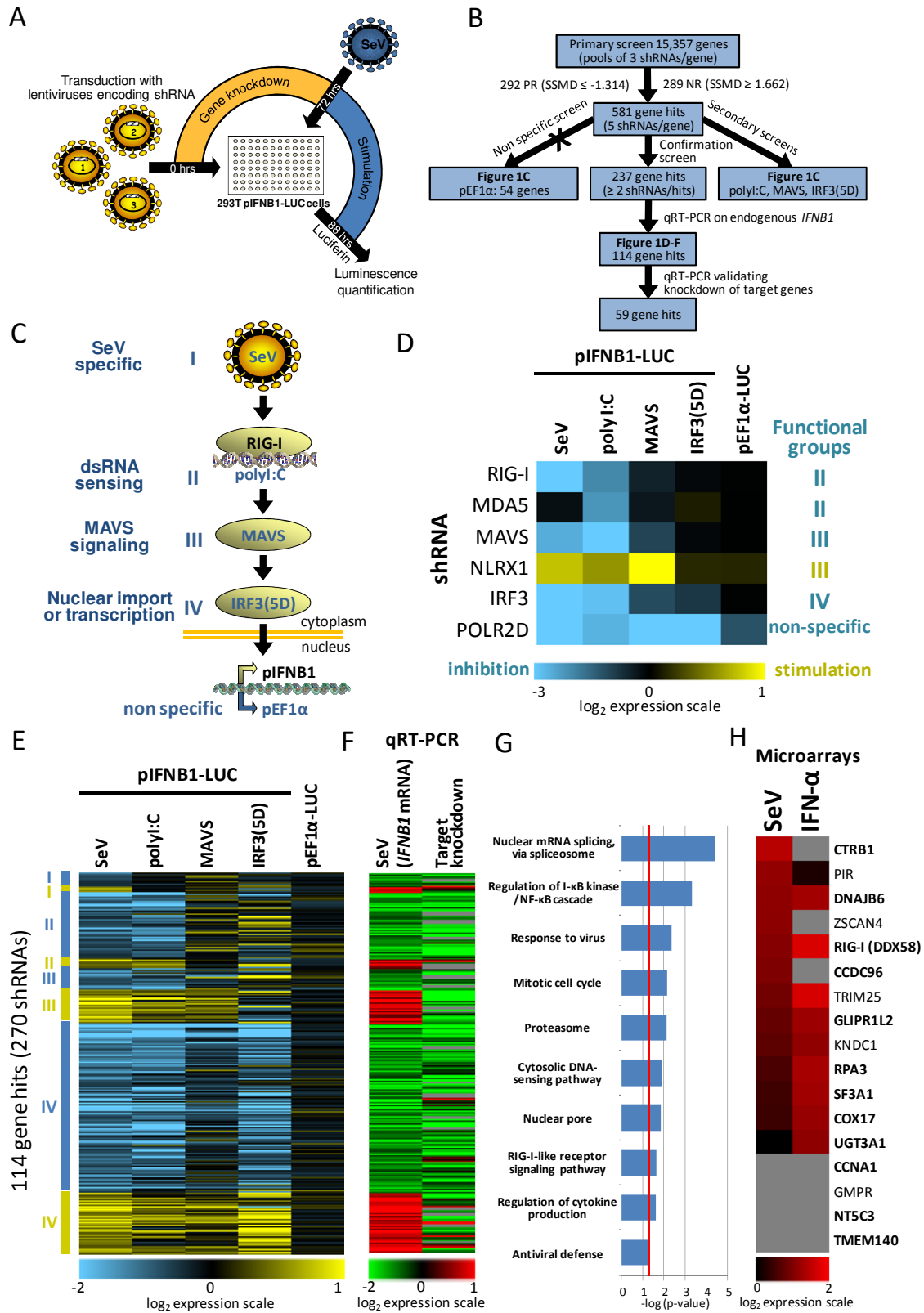


Figure II.1: Genome-wide gene silencing study of virus-induced innate immune responses and bioinformatics analyses.

(A) Schematic representation of the primary genome-wide screen and secondary screens. HEK 293T cells stably expressing the luciferase gene under the control of the *IFNB1* promoter were transduced with arrayed lentiviruses combining three shRNAs per gene (primary screen) or with five individual shRNA-expressing lentiviruses for each gene hit (secondary screens) in a 96-well format. After 72 hours, cells were challenged with SeV virus (primary and confirmation screens) or transfected with polyI:C, MAVS or IRF3(5D) (secondary screens) for 16 hours before measuring *IFNB1* promoter-driven luciferase activity.

(B) Decision tree of primary screen and summary data of gene hits obtained in secondary and validation screens. Selected gene hits (114) that were confirmed and validated with endogenous *IFNB1* screens by qRT-PCR induced a modulation of more than 25 % of the *IFNB1* promoter activity with at least two independent shRNAs following SeV infection. Prioritized gene hits (59) for which knockdown of the target gene was greater than 40% with two independent shRNAs are also identified.

(C) Schematic representation of confirmation and secondary assays for epistasis analysis of gene hits acting on the signaling cascade leading to *IFNB1* production. SeV infection (primary and confirmation screens), polyI:C (dsRNA mimetic), MAVS or IRF3(5D) transfection (secondary screens) were used to activate innate immune response. A non-specific assay was used to discard gene hits affecting nonimmune-related transcription by measuring transcriptional activity of EF1 α constitutive promoter.

(D) Heat map indicating modulation of *IFNB1* promoter activity following silencing of control genes in confirmation and secondary assays (log₂ scale). The functional profiling data for controls and gene hits allow classification within four functional groups: I - SeV recognition, II - cytoplasmic dsRNA sensing, III - MAVS-dependent signaling, IV - nuclear import or transcription factor-dependent process.

(E) Functional profiling data of 114 gene hits confirmed with at least two shRNAs in the SeV confirmation screen and further validated using endogenous *IFNB1* mRNA quantification by qRT-PCR. Manual clustering was performed to classify each gene hit in one of the four functional groups.

(F) qRT-PCR validation data of the endogenous *IFNB1* mRNA levels and target gene knockdown efficiency in transduced cells with each lentivirus-expressing shRNA for the 114 gene hits.

(G) Enriched Gene Ontology (GO) biological process and molecular function terms ($P < 0.05$) for the 114 genes confirmed by qRT-PCR relative to all genes examined in the genome-wide RNAi screen.

(H) Identification of 17 out of 237 gene hits that are induced by more than twofold after SeV infection or IFN- α treatment in our microarray analysis of HEK 293T cells (13 genes) are previously described as ISGs (4 genes in gray) [13]. The gene hits (12 out of 114) that modulate endogenous *IFNB1* mRNA are indicated in bold.

II.3.2 Bioinformatics analysis of gene hits

To create a more comprehensive view of all prioritized gene hits in the regulation of antiviral innate immune responses, we performed a bioinformatics meta-analysis that integrates the data of our functional genomics screen with previous functional and proteomic studies. Gene ontology (GO) molecular functions of the 114 gene hits identified enrichment for 10 statistically significant terms encompassing expected terms: regulation of the NF- κ B cascade, response to virus, RLR signaling pathway, regulation of cytokine production and antiviral defense, as well as the interesting functional groups: nuclear pore, proteasome and spliceosome (**Figure II.1G**). Additional microarray analysis was performed to identify genes that were induced by more than twofold following SeV infection or IFN- α treatment. Based on our gene profiling analysis and previously described ISGs [13], 17 out of 237 gene hits were identified as ISGs (**Figure II.1H**). Globally, identified gene hits were significantly enriched in ISGs (12 out of 114 genes or 10.5 %) compared to a 2.0 % representation of the human genome. The analysis also identified four nuclear pore complex (NPC) genes: nucleoporin 93kDa (NUP93), RAN member RAS oncogene family (RAN), nucleoporin like 1 (NUPL1) and Exportin 1 (CRM1 homolog, yeast) (XPO1) within the group IV that significantly reduced virus-induced IFNB1 transcription upon individual gene perturbation. This example highlights a central role of XPO1-containing protein complex in innate antiviral response that is targeted by several viruses. Indeed, XPO1 is implicated in the nuclear export of the 60S ribosomal RNA subunit (rRNAs) [462] and specific mRNAs (IFNA1 mRNA [463]), and also contributes to the transport of viral proteins and RNA transcripts [464]. Interestingly, XPO1-dependent export of HIV-1 Rev protein required the DExD box RNA helicase DDX3 [465], which plays

a role in type I IFN induction through TBK1/IKBKE (also known as IKK ϵ)-mediated phosphorylation of IRF3 [231, 466].

In order to identify common proteins functioning as sensors of different danger signals and effectors of innate response, and as host antiviral restriction factors targeted by viruses, we compared gene hits of our RLR screen to those of biologically relevant RNAi screens for pathogen replication (HIV [467-469], HCV [470, 471], Influenza [472-474] and West Nile virus [475]) and for Nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptor (NLR) response [476] (**Figure II.11**). These screens were performed with different genome-wide libraries, cell lines, reporters and experimental design. Nevertheless, the overlap analysis identified 58 putative modulators of virus-induced innate responses that are also associated to virus infection, and 9 common modulators of the RLR- and NLR-mediated recognition and signaling pathway (**Supplementary Table II S1**). These overlapping genes are significantly enriched for functional groups proteasome and spliceosome and for the RLR, NLR and cancer pathways. Our comparison also highlights four shared genes between the three type of RNAi screens: RELA/p65, central component of the NF- κ B pathway; RIPK2 a serine/threonine protein kinase containing a C-terminal caspase activation and recruitment domain (CARD) acting as a potent activator of NF- κ B [477]; KLF6, a zinc finger protein recently identified as critical transcription factor required for innate immune response against influenza virus [478] and CYP2U1, a hydroxylase member of the cytochrome P450 superfamily of enzymes involved in the synthesis of lipids that was suggested as a modulator signal transduction within inflammatory and immune cells in the thymus [479]. Our genome-wide shRNA screen complements previously available immune and viral replication screens to enrich the global

interaction networks of innate immune response (see **Figure II.8**), which could identify targets for the development of broad-spectrum antivirals.

II.3.3 Secretion of WNT2B and WNT9B acts in a feedback inhibition of SeV-induced *IFNB1* transcription

The RNAi screen identified gene hits encoding WNT ligands that modulate virus-induced innate response. WNT ligands are a family of highly conserved secreted glycoproteins that regulate multiple processes in development and tissue homeostasis. These processes are mediated through canonical WNT/ β -catenin (CTNNB1) and non-canonical WNT pathways [480, 481]. In recent years, few studies have reported a role of WNT pathway in the regulation of inflammation. In *drosophila*, WntD was shown to act as a feedback inhibitor of the NF- κ B homolog Dorsal in response to bacterial infection [482]. More recently, Wnt2 and Wnt11 were shown to inhibit bacterial-induced inflammation in intestinal epithelial cells in mouse [483, 484]. We identified two highly prioritized genes encoding WNT2B (also called WNT13, NR group IV) and WNT9B (also called WNT15 and WNT14B, NR group IV), which upon gene silencing significantly increased gene transcription of the pIFNB1-LUC reporter construct and of the endogenous *IFNB1* promoter in SeV-infected cells (**Figure II.2A**). The knockdown of both WNT ligands increased pIFNB1-LUC expression induced by transfected polyI:C and overexpression of MAVS and of IRF3(5D), consistent with a regulatory role of the antiviral response in a feedback inhibition loop (**Figure II.2A**). SeV infection led to a significant increase of the virus-induced representative proteins IFIT1 (ISG56), IFIT2 (ISG54) and DDX58 (RIG-I) at 16 hours post-infection with knockdown of WNT2B or WNT9B by two independent shRNAs (**Figure II.2B** and **Figure II.S3** for knockdown efficiency). The increased pIFNB1-LUC expression upon WNT2B or WNT9B silencing is further illustrated

by enhancement of *IFIT1* mRNA induction levels, and more importantly by increased levels of IFN- β protein in the supernatant of infected cells (**Figures II.2C-E**). As an example, we observed in WNT9B knockdown cells versus control cells transduced with shRNA NT more than 6,000 pg/mL of secreted IFN- β protein (versus 250 pg/mL), a 650-fold in *IFNB1* mRNA (versus 100-fold), a 800-fold in *IFIT1* mRNA (versus 250-fold), and a 100-fold increase in NF- κ B-driven *TNF* mRNA levels (versus 50-fold in control shRNA NT cells) (**Figures II.2E and S4**). Co-transfection of shRNA-resistant expression vectors for WNT2B or WNT9B rescued the knockdown by decreased pIFNB1-LUC expression excluding shRNA off-target effects (**Figure II.S5**).

We then investigated the modulation in gene expression of the two WNT ligands following virus infection. Since WNT2B and WNT9B mRNA levels are barely inducible (less than 2-fold) in all conditions tested (**Figure II.S6**), we evaluated the secretion of ectopically expressed WNT2B and WNT9B upon SeV infection and IFN- α treatment (**Figure II.2F**). Our data revealed a secretion of WNT2B that build-up until 8 hours post-infection, while no secretion was observed with IFN- α treatment. The virus-induced secretion of WNT2B was also confirmed in cervical-derived HeLa and hepatoma Huh7 human cells (**Figure II.S7A**). In contrast, WNT9B is rapidly secreted with IFN- α treatment, while its secretion is merely initiated 8 hours post SeV infection, a time point correlating with virus-induced *IFNB1* expression (**Figure II.S6**). We then confirmed the requirement of virus-induced WNT secretion for the negative regulation of *IFNB1* transcription by perturbation of wntless homolog (Drosophila) (*WLS*) gene encoding a conserved membrane protein dedicated to WNT secretion in signaling cells [485-487]. Indeed, we observed that silencing of WLS reduced WNT secretion (**Figure II. S7B**), and increased the expression of *IFIT1*, *IFIT2* and *DDX58*

proteins, *IFIT1* mRNA levels and secretion of IFN- β protein induced by SeV in HEK 293T cells (**Figures II. 2B, 2D, 2E** and **II.S3** for knockdown efficiency).

Finally, to confirm a direct role of WNT ligand in the negative regulation of *IFNB1* mRNA expression, we incubated SeV-infected cells with purified WNT proteins. As expected, purified WNT9B decreased virus-induced pIFNB1-LUC activity, as well as mRNA levels of *IFNB1* and of *IFIT1* from endogenous promoters, by up to threefold in dose-response without affecting the constitutive EF1 α promoter (**Figures II.2H-J**). In control experiments, purified WNT9B weakly induced the CTNNB1-dependent TCF/LEF-promoter driven reporter activity (M50 Super 8xTOP-flash [488]) by less than 3-fold while purified WNT3A protein achieved a 60-fold induction of reporter activity (**Figure II.2G**). In addition, purified WNT3A weakly decreased SeV-induced *IFNB1* and *IFIT1* transcription and at concentrations (250 nM) well above those required to promote CTNNB1 TCF/LEF-dependent reporter activity (compare **Figures II.2G** with **Figures II.2I** and **II.2J**). Overall, these results strongly support a specific effector role of virus-induced secretion of WNT2B and WNT9B ligands in innate immunity, acting in a feedback inhibition of IRF3- and NF- κ B-dependent *IFNB1* response to virus infection.

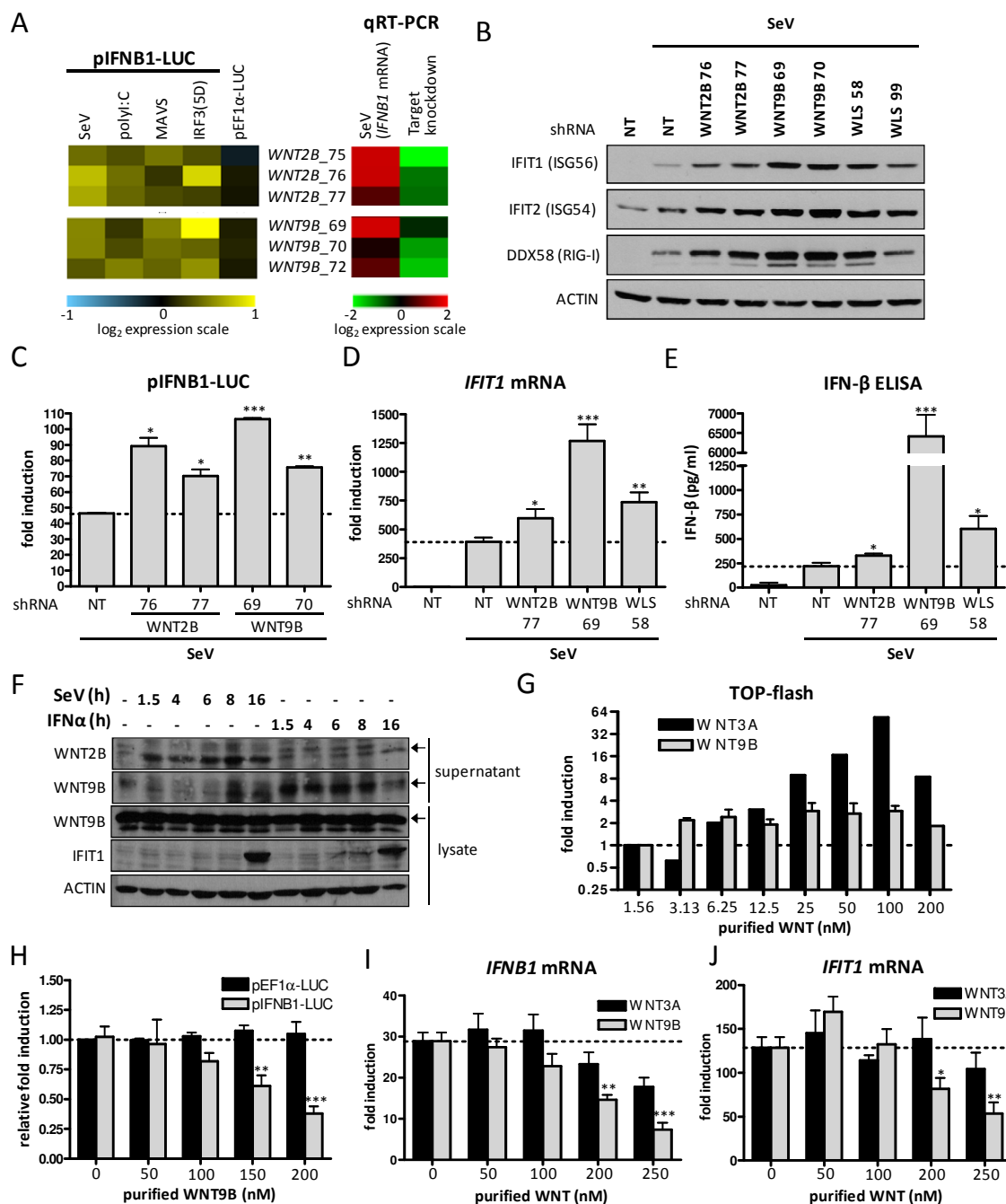


Figure II.2: WNT2B and WNT9B ligands as novel negative regulators of antiviral innate immunity.(A) Heat map indicating log₂ effect of silencing WNT2B and WNT9B genes with 3 independent lentivirus-expressing shRNAs (left) and qRT-PCR validation of endogenous *IFNB1* mRNA levels and of target gene knockdown efficiency (right). (B) Immunoblot analysis of IFIT1, IFIT2 and DDX58 in WNT2B, WNT9B and WLS knockdown HEK 293T cells (two-independent shRNAs per gene) following infection with SeV for 16 hours. (C) *IFNB1* promoter-driven luciferase activity in HEK 293T cells treated as described in (B). (D) Fold induction of *IFIT1* mRNA levels in HEK 293T cells treated as described in

(B). qRT-PCR determination represents the average mRNA RQ normalized versus ACTIN and HPRT1 mRNA. (E) ELISA quantification of secreted IFN- β protein in supernatant of HEK 293T cells treated as described in (B). (F) Immunoblot analysis of HEK 293T supernatants and lysates at various time points in cells overexpressing WNT2B and WNT9B and infected with SeV or treated with IFN- α . The specific bands are indicated with arrows. (G) Fold induction of CTNNB1-TCF/LEF dependent reporter activity (TOP-flash) with addition of purified WNT3A or WNT9B proteins to HEK 293T cell supernatants for 16 hours. (H) Relative fold induction of *IFNB1*- or *EF1 α* -driven reporter activity with dose-dependent addition of purified WNT9B protein to cell supernatants of SeV infected HEK 293T cells for 16 hours. (I–J) Fold induction of *IFNB1* (I) or *IFIT1* (J) mRNA levels following dose-dependent addition of purified WNT3A or WNT9B proteins to cell supernatants of SeV infected HEK 293T cells for 16 hours. qRT-PCR determination represents the average mRNA RQ normalized versus ACTIN and HPRT1 mRNA. P values <0.05 (*), <0.01 (**) or <0.001 (***) are indicated.

II.3.4 CTNNB1 negatively regulates *IFNB1* gene expression

In a canonical WNT pathway, WNT ligands bind to cell-surface receptors of the frizzled family receptor (FZD) and low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5/6, activate dishevelled (DVL) and ultimately result in stabilization of cytoplasmic CTNNB1 and its nuclear translocation. The process is mediated by the WNT/LRP-signalosome through recruitment at cell membrane of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3B) and AXIN, disrupting the cytoplasmic GSK3B/AXIN/adenomatous polyposis coli (APC) destruction complex of CTNNB1. WNT-mediated activation of CTNNB1 promotes specific gene expression via interaction with TCF/LEF transcription factors. While SeV infection per se do not induce TCF/LEF transcription (data not shown), we investigated the contribution of CTNNB1 on SeV-mediated *IFNB1* and *IFIT1* induction to better understand mechanistically the role of WNT2B/WNT9B in the regulation of innate immunity. The knockdown of *CTNNB1* gene produced the expected enhancement in virus-induced p*IFNB1*-LUC reporter activity and in *IFIT1* protein levels (**Figures II.3A and II.3B**). Knockdown of *CTNNB1* gene by specific shRNA and siRNAs also enhanced induction of DDX58 protein levels, of mRNA levels of

IFNB1, *DDX58* and *TNF* from endogenous promoters and notably increased secretion of IFN- β protein (**Figures II.3C-G** and **Figure II.S3** for knockdown efficiency). Conversely, the ectopic expression of CTNNB1 resulted in diminution of virus-induced *IFNB1* transcription in a dose response manner, while promoting the TCF/LEF-dependent reporter activity in control experiments (**Figures II.3H** and **II.3I**). To test the potential additive effect of WNT2B and WNT9B knockdown and to confirm that these WNTs act through CTNNB1 in regulating innate antiviral immunity, we performed double knockdown experiments. We showed an additive effect of the knockdown of WNT2B and WNT9B together in enhancing IFNB1 induction following SeV infection (**Figure II.S8**). However, the knockdown of WNT2B or WNT9B in combination with CTNNB1, as expected, do not further increase IFNB1 induction when compared to the knockdown of CTNNB1 alone (**Figure II.S8**).

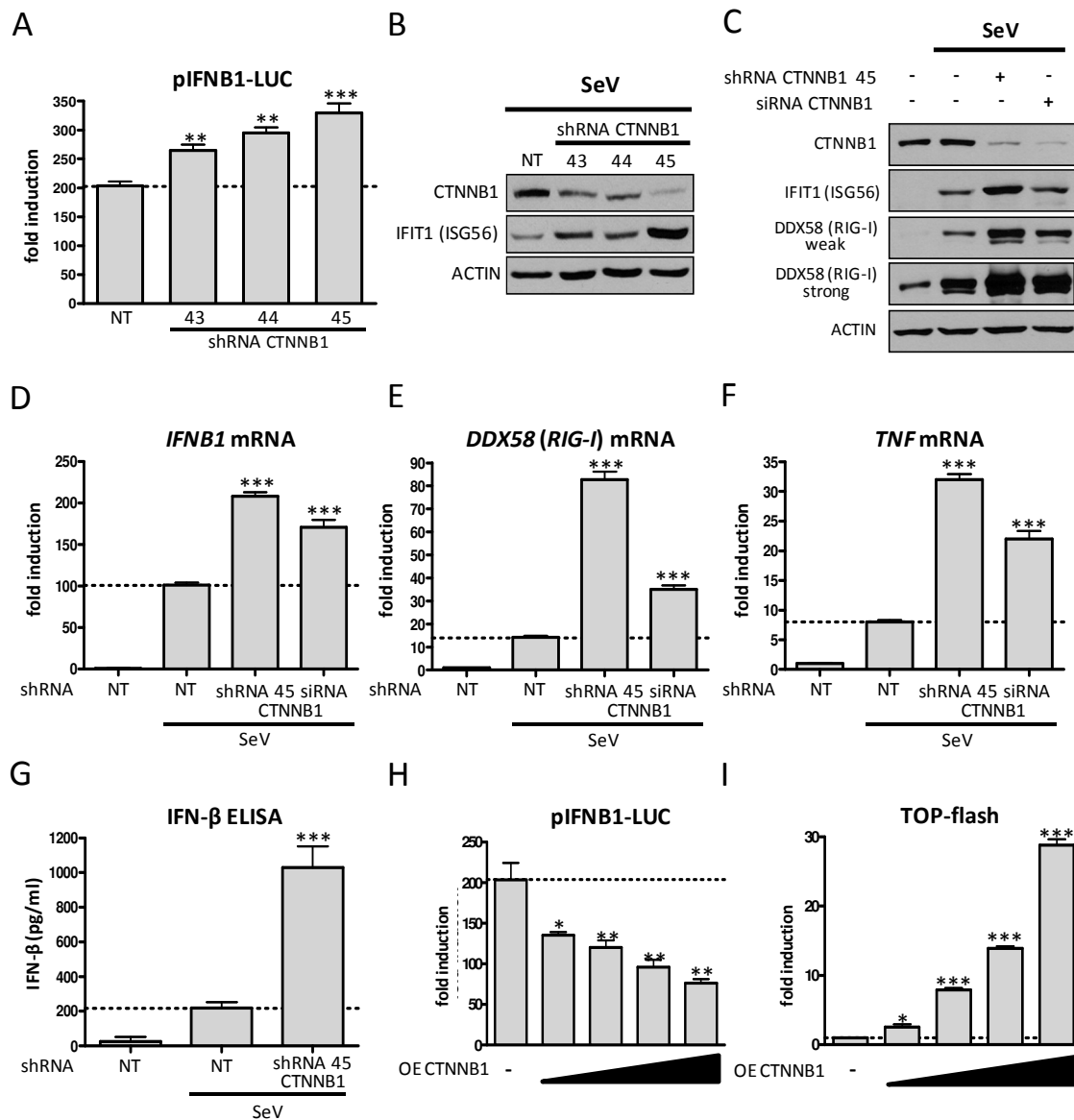


Figure II.3: CTNNB1 is a negative regulator of antiviral innate immunity. (A) *IFNB1* promoter-driven luciferase activity in HEK 293T cells transduced with lentivirus-expressing shRNA NT (control) or 3 shRNAs targeting CTNNB1 for four days and subjected to SeV infection for 16 hours. (B) Immunoblot analysis of CTNNB1 and IFIT1 in HEK 293T cells transduced with 3 lentivirus-expressing shRNAs targeting CTNNB1 and infected with SeV. (C) Immunoblot analysis of CTNNB1, IFIT1 and DDX58 in SeV-infected HEK 293T cells previously transduced with a shRNA or transfected with a pool of four siRNAs targeting CTNNB1 for three days. (D–F) Fold induction of *IFNB1* (D), *DDX58* (E) and *TNF* (F) mRNA levels in HEK 293T cells treated as described in (C). qRT-PCR determination represents the average mRNA RQ normalized versus ACTIN and HPRT1 mRNA. (G) ELISA quantification of secreted IFN-β protein in supernatant of HEK 293T cells treated as described in (A). (H–I) Fold induction of *IFNB1* promoter-driven luciferase activity (H) and of CTNNB1-TCF/LEF

dependent reporter activity (TOP-flash, I) following dose-dependent transfection of CTNNB1-expressing plasmid (50, 100, 150 and 200 ng) for 48 hours in SeV-infected HEK 293T cells.

We then confirmed the stabilization of endogenous CTNNB1 upon SeV infection in a kinetics study. Indeed, immunoblot analysis of infected cell extracts demonstrated the progressive increase in activated CTNNB1 (dephosphorylated on Ser37 or Thr41) from 4 to 24 hours post-infection, followed by a slight decrease at 48 hours (**Figure II.4A**). The stabilization of CTNNB1 following SeV infection is also observed following ectopic expression of a FLAG-tag CTNNB1 protein (**Figure II.S12B**). Importantly, the kinetic showed no induction in the basal level of phosphorylated CTNNB1 Ser552 upon SeV infection, in contrast to LRRFIP1-dependent phosphorylation of CTNNB1 at Ser552 upon infection with *Listeria monocytogenes* promoting its transcriptional activation required for IFNB1 production in mouse macrophages [123]. Moreover, the kinetics study of SeV infection performed in CTNNB1 knockdown cells clearly showed that blocking CTNNB1 accumulation upon gene silencing correlated with increased activation of the antiviral response as demonstrated by the protein level of IFIT1 and DDX58, as well as phosphorylated level of NFKBIA (IkB α) at serine 32, an indicator of NF- κ B activation (**Figure II.4A**). IFIT and DDX58 proteins increased from 24 to 48 hours post-infection while phosphorylated NFKBIA increased up to 32 hours post-infection in CTNNB1 knockdown cells. As a control, we show that this increase in innate antiviral response is not a consequence of increased viral replication, since the level of SeV hemagglutinin-neuraminidase (HN) viral protein is unchanged in CTNNB1 knockdown cells.

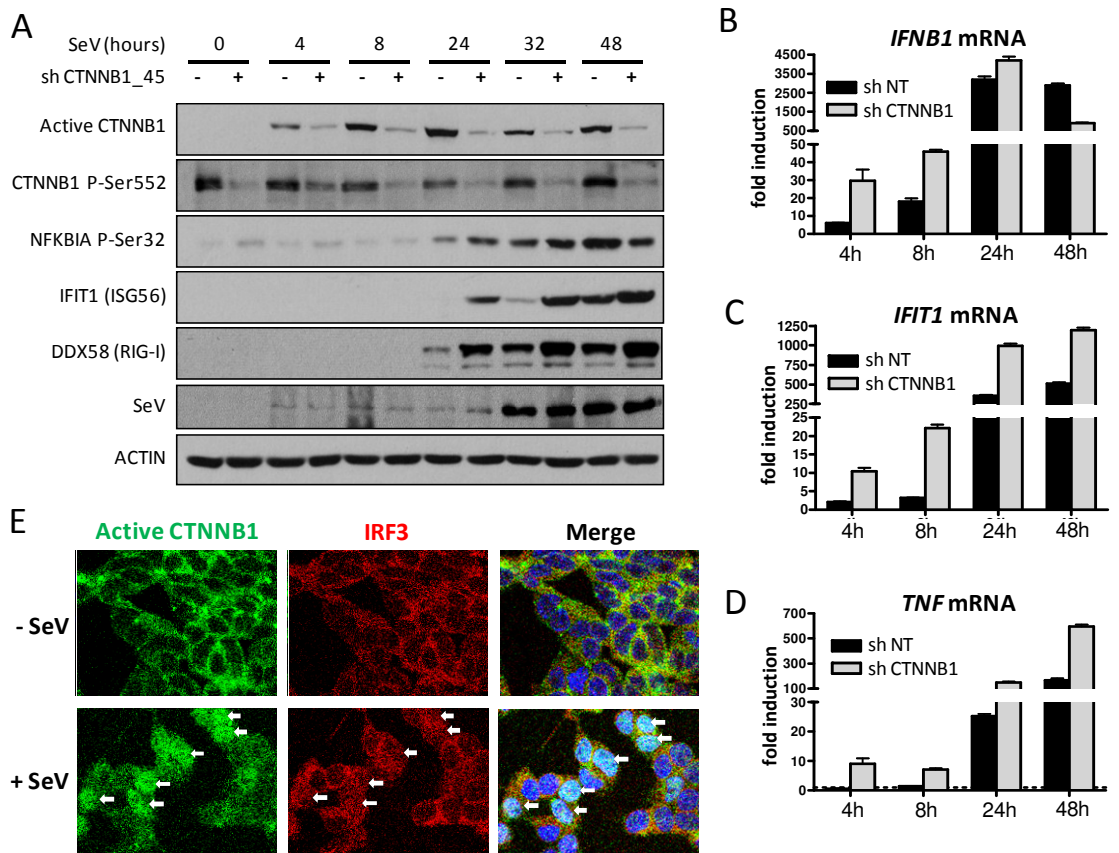


Figure II. 4: SeV infection induces CTNNB1 stabilization and nuclear translocation.

(A) Immunoblot analysis of dephosphorylated active CTNNB1 at Ser37/Thr41, CTNNB1 phosphorylated at Ser552, NFKBIA ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) phosphorylated at Ser32, IFIT1, DDX58 and SeV protein HN of HEK 293T transduced with lentivirus-expressing shRNA 45 targeting CTNNB1 and shRNA NT (control) for four days and subjected to SeV infection for 0, 4, 8, 24, 32 or 48 hours. (B–D) Fold induction of *IFNB1* (B), *IFIT1* (C) and *TNF* (D) mRNA levels in HEK 293T cells treated as described in (A). qRT-PCR determination represents the average mRNA RQ normalized versus ACTIN and HPRT1 mRNA. (E) Confocal analysis of HEK 293T cells using Hoechst, anti-CTNNB1 active form and anti-IRF3 antibodies without virus infection or following 16 hours infection with SeV. Nuclear detection of IRF3 and CTNNB1 is identified by white arrows in infected cells.

In addition, qRT-PCR quantification of *IFNB1*, *IFIT1* and *TNF* mRNA levels showed increase in their promoter activity up to seven-fold in CTNNB1 knockdown cells (Figures II.4B, 4C and 4D). Interestingly, a more rapid decline of the *IFNB1* mRNA level is observed at 48 hours post-infection (Figure II.4B) compared to *IFIT1* and *TNF* mRNA levels, which remained

higher at this time point (**Figures II.4C and 4D**). In immunofluorescence experiments, we specifically followed the cytoplasmic CTNNB1 regulated by the GSK3B destruction complex using the antibody specific to the activated/dephosphorylated CTNNB1. Following infection, CTNNB1 is detected in the nucleus of SeV-infected HEK 293T cells, similarly to IRF3 (**Figure II.4E**). Similar results were observed in infected A549 cells together with a nuclear co-staining of CTNNB1 and NF- κ B (**Figure II.S9**). Altogether, our data strongly suggest that the stabilization and/or accumulation of CTNNB1 in the nucleus upon virus-induced WNT secretion triggered a CTNNB1-dependent negative feedback loop to reduce antiviral innate immune responses.

II.3.5 GSK3 inhibitors block innate response through CTNNB1 stabilization

Since the inhibition of GSK3B catalytic activity results in CTNNB1 cytoplasmic accumulation, we then investigated a role of GSK3 in the negative regulation of *IFNB1* induction (**Figure II.5A**). The inhibition of GSK3A/B activity with specific inhibitors BIO (5 μ M) and BIO-acetoxime (10 μ M) was confirmed by lack of autophosphorylation at Tyr279/Tyr216, respectively, using phospho-specific antibodies (**Figure II.5C**). As expected, pharmacological inhibition of GSK3 increased active CTNNB1 levels (dephosphorylated on Ser37 or Thr41) that correlated with the CTNNB1 TCF/LEF-dependent reporter activity (**Figures II.5B and 5C**). More importantly, the inhibition of GSK3 resulted in a drastic reduction of virus-induced *IFNB1* transcription as well as expression of IFIT1 and of NFKBIA phosphorylation at serine 32 when compared to untreated SeV-infected cells (**Figures II.5A, 5C and 5D**). As GSK3 phosphorylates multiple substrates other than CTNNB1 affecting different pathways, we further demonstrated that the decrease in virus-dependent induction of pIFNB1-LUC, IFIT1 and phosphorylated NFKBIA by GSK3 inhibitors is specifically

abolished in CTNNB1 knockdown cells (**Figures II.5A and 5D**). Parallel transcriptional changes were observed with *IFNB1*, *IFIT1* and *TNF* mRNA levels (**Figure II.S10A-C**). Finally, similar restoration of the antiviral response was observed in GSK3 inhibitor-treated CTNNB1 knockdown A549 cells following SeV infection (**Figure II.S10D**). In control experiments, increased CTNNB1 TCF/LEF-dependent reporter activity with pharmacological inhibition of GSK3 was also specifically abrogated by knockdown of CTNNB1 (**Figure II.5B**). To verify if the inhibition of the innate antiviral response observed upon pharmacological stabilization of CTNNB1 was a consequence of its transcriptional activity through the induction of TCF/LEF-dependent genes, we used the CTNNB1-TCF interaction inhibitor PNU74654 [489]. The addition of PNU74654 (6 μ M) reduced the GSK3 inhibitor-mediated TOP-flash induction by 70 %, without restoring innate antiviral response to SeV infection as determined by pIFNB1-LUC, pISG56-LUC and p2xNF- κ B-LUC reporter activities (**Figure II.5E**). This experiment rule out a role of TCF/LEF inducible genes by the canonical WNT pathway (involved in embryonic development or cell fates during normal development) as part of the negative regulation of innate antiviral immunity. Altogether, the results strongly suggest a key role of GSK3 catalytic activity in a feedback inhibition of the antiviral innate immune response mediated by a canonical-like WNT2B/WNT9B/CTNNB1 pathway.

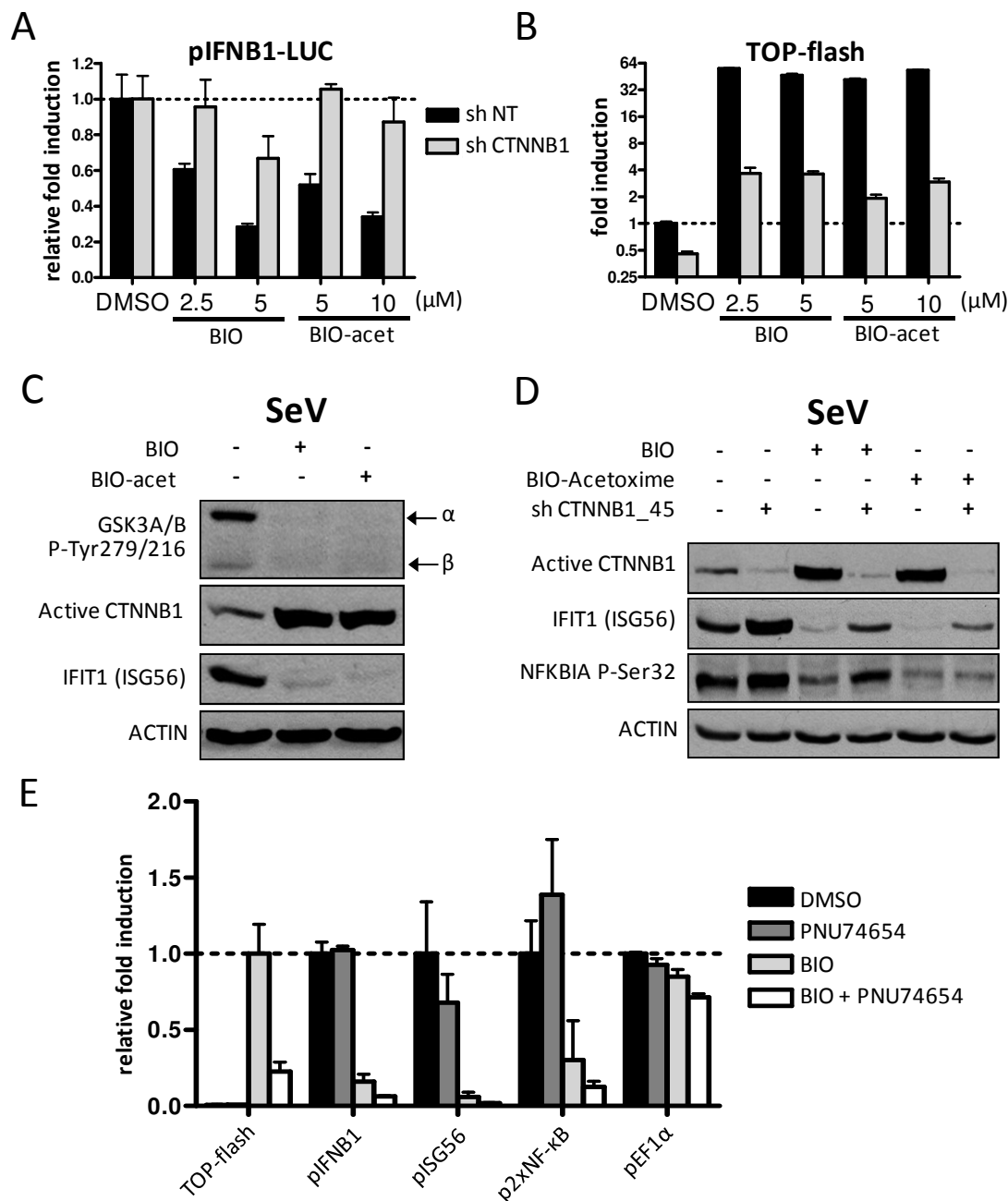


Figure II.5: Pharmacological inhibition of GSK3 stabilizes an active CTNNB1 pool and negatively regulates antiviral innate immunity. (A–B) Relative fold induction of *IFNB1*-driven reporter activity (A) and fold induction of CTNNB1-TCF/LEF dependent reporter activity TOP-flash (B) in HEK 293T cells transduced with lentivirus-expressing shRNA NT (control) or shRNA 45 targeting *CTNNB1* for four days and subjected to GSK3 inhibition with BIO (5 μ M) or BIO-acetoxime (10 μ M) and SeV infection for 16 hours. (C) Immunoblot analysis of autophosphorylated GSK3 α/β at Tyr279/216, dephosphorylated active CTNNB1 at

Ser37/Thr41 and IFIT1 in HEK 293T cells treated with GSK3 inhibitors BIO (5 μ M) or BIO-acetoxime (10 μ M) and infected with SeV for 16 hours. (D) Immunoblot analysis of dephosphorylated active CTNNB1 at Ser37/Thr41, IFIT1 and phosphorylated NFKBIA (I κ B α) at Ser32 in SeV-infected HEK 293T cells treated as described in (A–B) and treated with BIO (5 μ M) or BIO-acetoxime (10 μ M). (E) Relative fold induction of TOP-flash, *IFNB1*, *ISG56*, *NF- κ B* and *EF1 α* -driven reporter activity in HEK 293T cells subjected to GSK3 inhibition with BIO (5 μ M), TCF/LEF interaction inhibition with PNU74654 (6 μ M) or both inhibitors prior to SeV infection for 16 hours.

II.3.6 WNT/CTNNB1 pathway negatively regulates innate immune response in primary human cells

The regulation of antiviral innate immunity by a WNT/CTNNB1 pathway was further investigated in primary cultures of normal human bronchial epithelial cells (NHBE), human monocyte-derived macrophages (MDM) and human hepatocytes. The negative regulation of SeV-induced innate response was demonstrated in NHBE cells as shown by the knockdown of WNT2B, WNT9B and CTNNB1, which increased *IFNB1* mRNA levels by up to five folds (**Figure II.6A**) and *TNF* mRNA levels by up to six folds (**Figure II.6B**). Significant increased *IFNB1* and *TNF* mRNA levels are also observed in WLS knockdown cells (1.5 to 2 folds). We demonstrated the key contribution of CTNNB1 in immune cells and showed that the treatment of MDM with GSK3 inhibitors led to a robust inhibition in *IFNB1* and *IFIT1* mRNA levels up to 90 %, in accordance with results obtained in non immune cells (**Figure II.6C**). However, *TNF* mRNA induction was systematically weakly or unaffected by GSK3 inhibitor treatment, demonstrating some differences in regulation of MDM compared to epithelial cells at 4 hours post-infection. We also confirmed in normal human hepatocytes cells that the pharmacological inhibition of GSK3 resulted in a drastic inhibition of virus-induced *IFIT1* transcription and is abrogated in CTNNB1 knockdown cells (**Figure II.6D**). More importantly, we emphasized the contribution of the GSK3/CTNNB1 in regulation of innate immune response following

hepatitis C virus (HCV) infection. Indeed, incubation of primary human hepatocytes with the full-length HCV strain JFH1 for 48 hours led to induction of IFIT1 protein levels (**Figure II.6E**). Using this model, we showed a drastic inhibition of IFIT1 levels when treating hepatocytes with the GSK3 inhibitor BIO, and in accordance with previous data, a restoration in GSK3 inhibitor-treated CTNNB1 knockdown cells (**Figure II.6E**). It is noteworthy that treatment with GSK3 inhibitor did not affect levels of HCV NS3 protease in these primary hepatocytes, confirming that the observed effect on IFIT1 protein is not related to an alteration of HCV infection at early time points. The observed increase in innate immunity and decrease in NS3 protein of HCV-infected primary hepatocytes knocked down for CTNNB1 prompted us to evaluate the quantitative effect of WNT/CTNNB1 signaling on HCV infection. Indeed, we observed a reduced HCV replication upon knockdown of WNT2B, WNT9B, WLS and CTNNB1 in Huh7 cells using the reporter HCV J6/JFH-1(p7-Rluc2A) infectious virus (**Figure II.6F**). Up to 80 % inhibition in HCV infection was observed in CTNNB1 knocked down cells, an effect similar to the silencing of Y-box-binding protein-1 (YB1) in a positive control that we previously identified as a cofactor of HCV replication and assembly [490]. Altogether, these results confirm the role of a canonical-like WNT/GSK3/CTNNB1 pathway in a negative regulation of innate immunity upon virus infection of different primary human cells including immune cells.

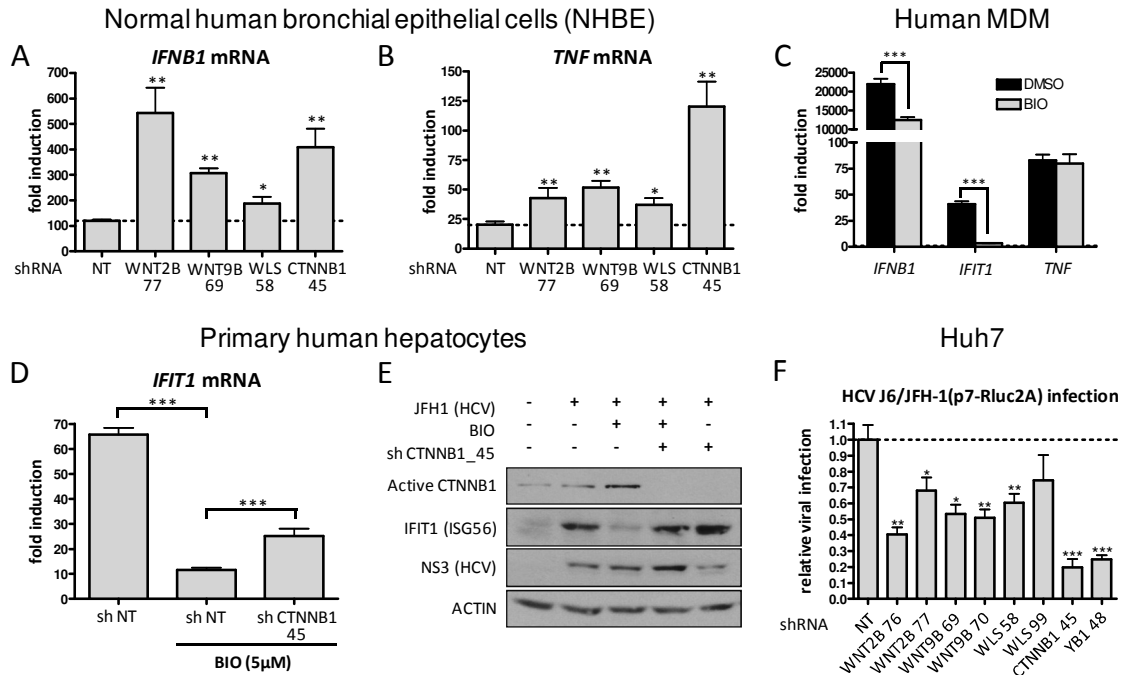


Figure II.6: WNT/CTNNB1 signaling acts as a negative regulator of the innate immune response in primary human cells. (A–B) Fold induction of *IFNB1* (A) and *TNF* (B) mRNA levels in NHBE cells transduced with lentivirus-expressing shRNA 77 targeting *WNT2B*, shRNA 69 targeting *WNT9B*, shRNA 58 targeting *WLS*, shRNA 45 targeting *CTNNB1* and NT shRNA in control cells for four days and infected with SeV for 16 hours. (C) Fold induction of *IFNB1*, *IFIT1* and *TNF* mRNA levels in human monocyte-derived macrophages subjected to GSK3 inhibition with BIO (5 μ M) and SeV infection for 4 hours. qRT-PCR determination represents the average mRNA RQ normalized versus ACTIN and HPRT1 mRNA. (D) Fold induction of *IFIT1* mRNA in primary human hepatocytes transduced with lentivirus-expressing shRNA NT or shRNA 45 targeting *CTNNB1* for four days and subjected to GSK3 inhibition with BIO (5 μ M) and SeV infection for 5 hours. qRT-PCR determination represents the average mRNA RQ normalized versus ACTIN and HPRT1 mRNA. (E) Immunoblot analysis of dephosphorylated active CTNNB1 at Ser37/Thr41, IFIT1 and HCV NS3 protease in primary human hepatocytes either transduced with lentivirus-expressing shRNA 45 targeting CTNNB1 for four days and/or subjected to GSK3 inhibition with BIO (5 μ M) and infected with Hepatitis C virus (HCV) strain JFH1 for 48 hours. (F) Huh7 cells transduced with shRNAs NT, WNT2B 76, WNT2B 77, WNT9B 69, WNT9B 70, WLS 58, WLS 99, CTNNB1 45 or YB1 48 (positive control) were infected with HCV J6/JFH-1(p7-Rluc2A) reporter virus. Following 96 hours of infection, Rluc was measure to assess HCV viral replication and results are represented as relative viral infection with shRNA NT treated cells arbitrarily set to 1. P values <0.05 (*), <0.01 (**) or <0.001 (***) are indicated.

II.3.7 Virus-induced CTNNB1 association with IRF3

To elucidate the underlying mechanism by which activation of a canonical-like WNT/CTNNB1 pathway decreases innate antiviral responses by negatively regulating IRF3- and NF- κ B- dependent production of IFN- β production, we determined if CTNNB1 physically interact with IRF3 and NF- κ B subunits by co-immunoprecipitation experiments. Immunoprecipitation followed by immunoblot analysis showed that SeV infection or treatment of cells with IFN- α increase the interaction of FLAG-IRF3 with endogenous CTNNB1 (**Figure II.7**). In contrast, the observed interaction of NF- κ B RELA/p65 subunit with endogenous CTNNB1 remains unchanged following these stimulations. Ectopic expression of FLAG-tagged IRF3, constitutively active IRF3(5D) and RELA/p65 further demonstrated an interaction with exogenous CTNNB1 in SeV-infected cells (**Figure II.S12A**). Reciprocal immunoprecipitation of FLAG-CTNNB1 in SeV-infected cells failed to detect interaction with endogenous IRF3 while confirmed the stable interaction with endogenous p65 (**Figure II.S12B**). Importantly, the sole increase in endogenous CTNNB1 by stabilization with a GSK3 inhibitor does not promote the interaction with IRF3 in the absence of viral infection (**Figure II.7 lane BIO**). Altogether, these results suggest a direct role of a virus-induced interaction of CTNNB1 with IRF3 in the negative regulation of innate immunity.

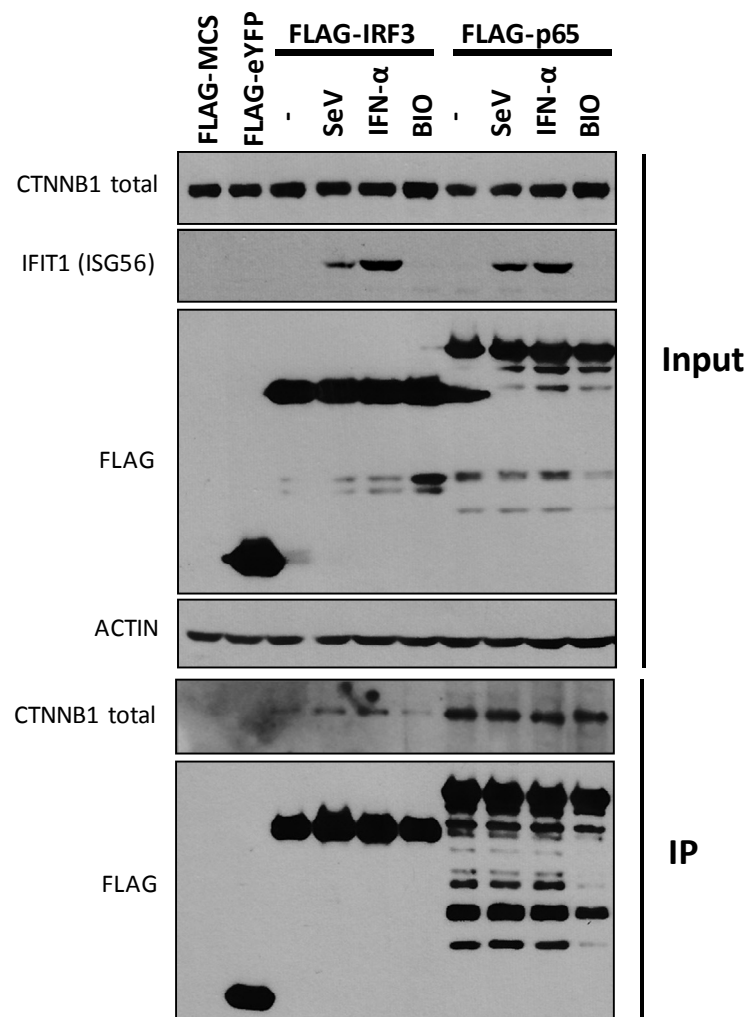


Figure II.7: CTNNB1 associates with IRF3 and NF- κ B subunit p65. HEK 293T cells were transfected with FLAG-MCS (control), FLAG-eYFP (control), FLAG-IRF3 or FLAG-p65 expressing plasmids for forty-eight hours. Cell extracts were prepared following 16 hours of treatment with IFN- α , GSK3 inhibitor BIO (5 μ M) or SeV infection before being subjected to immunoprecipitation directed against FLAG. Cell extracts and immune complexes were analyzed by Western blotting using anti-FLAG and anti-CTNNB1 antibodies.

II.4 Discussion

In this study, SeV infection of human cells was used to induce a robust *IFNB1* expression and to mount an effective type I IFN innate immune response with induction of antiviral ISGs. This provides a model to study virus sensing, signal propagation and feedback regulation

mechanisms at primary sites of virus infection. Here, a genome-wide gene silencing approach is used to uncover novel regulators of the antiviral innate immune response. The validation of the data will offer novel therapeutic avenues to control virus infection in pan-therapy, stimulate innate immunity in live virus vaccine, modulate oncolytic virus innate response in virotherapy and prevent excessive innate response in virus-mediated autoimmune diseases. The ultimate objective of our work is to better define the human innate immunity signalosome and to unravel mechanisms associated with viral infection and virulence.

We now report the data of the first RNAi screen assessing the silencing effect of ~15,000 human genes on transcriptional activity of the *IFNB1* promoter during SeV infection. We identified 237 gene hits that significantly modulated antiviral innate response in stringent confirmation and validation processes (**Table II.S1**). By designing secondary assays, gene hits were further classified according to a negative or positive action of encoded gene products within the IFNB1 signaling pathway from virus recognition to *IFNB1* expression. From the epistasis analysis, data with endogenous *IFNB1* promoter and gene silencing efficiency analysis, we identified 114 highly prioritized genes. The subcellular localization of proteins encoded by 96 of these prioritized gene hits is depicted in Figure 8 and includes the network connectivity using annotation information of various bioinformatics resources. Our study provides a comprehensive view of the regulation of innate immune responses by the RLR pathway, and complements the published RNAi screen by Yeretssian *et al.* who identified potential regulators of the nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD) pathway, a cytosolic PRR sensing peptidoglycans [476].

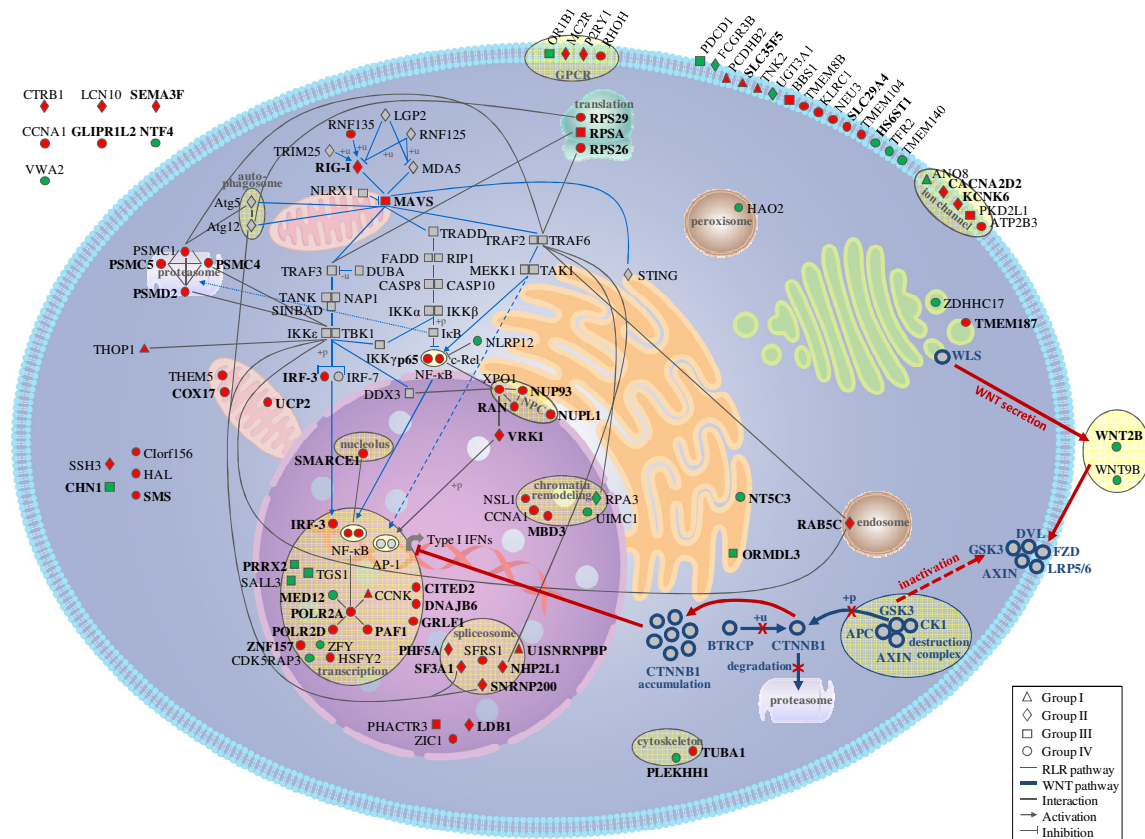


Figure II. 8: Cellular map of prioritized gene hits as potential modulators of innate immunity. Cellular mapping of gene products of 96 gene hits out of 114 that modulated endogenous *IFNB1* expression either as Positive Regulators (71 PRs: Red) or as Negative Regulators (25 NRs: green) of the signaling pathway following SeV infection. PRs and NRs were positioned on a cell map and classified according to sub-cellular compartments and cellular function using annotation information from Gene Ontology, KEGG pathway, Uniprot, NCBI and Ingenuity pathway Analysis (IPA). The four functional groups are represented by different symbols: I - SeV specific (triangle), II - cytoplasmic dsRNA sensing (diamond), III - MAVS-dependent signaling (square) and IV - Nuclear import or transcription factor-dependent process (circle). Gene hits with knockdown efficiency confirmed by qRT-PCR with at least two independent shRNAs are highlighted in bold (41 PRs and 9NRs). The RLR and WNT signaling pathways are represented in light and dark blue respectively. Virus-induced activation of the WNT/CTNNB1 canonical-like pathway in feedback inhibition of antiviral innate responses is indicated in red.

In this study, we provide evidence for novel functional links in the regulation of *IFNB1* and ISGs expression by components of a WNT pathway in virus-infected cells. We identified WNT2B and WNT9B as negative regulators of *IFNB1* transcription and IFN- β protein production acting downstream of IRF3(5D) activation of the innate immune response. We found that secretion of WNT proteins is induced by virus infection or IFN- α treatment and confirmed the requirement of WLS secretory function in a WNT-mediated regulatory role. We demonstrated that WNT secretion most likely results from virus-induced release of pre-existing intracellular pools rather than increased gene transcription. We also provided direct evidences that incubation of infected cells with purified WNT9B, but not WNT3A, reduced SeV-mediated *IFNB1* and *IFIT1* mRNA induction without significantly altering TCF/LEF-mediated gene transcription. This is further supported by the fact that SeV infection by itself do not induce transcription of TCF/LEF genes as measured by the TOP-flash reporter assay, and that a CTNNB1-TCF interaction inhibitor (PNU74654) has ruled out a role of TCF/LEF inducible genes in the regulation of innate immunity. These results prompt us to perform a biased RNAi screen targeting components of the WNT pathway, which included WNT ligands, FZD receptors and LRP co-receptors. WNT2B and WNT9B were confirmed as the only ligands acting significantly on virus-mediated *IFNB1* transcription among 16 tested WNT ligands (data not shown). We also observed a negative regulation phenotype for LRP5/6 and FZD5 knockdown cells (described as Wnt2b receptor [491]), which is coherent with activation of a WNT signalosome by WNT2B/WNT9B binding to trigger downstream signaling events in SeV-infected cells.

In order to uncover mechanistically the signaling pathways associated with WNT-receptor interaction and feedback inhibition of antiviral innate immune response, we investigated a

canonical-like WNT pathway that culminates in CTNNB1 accumulation. Coherently, we found that viral infection induces the accumulation of an active form of CTNNB1 and that *CTNNB1* gene silencing increases SeV-induced *IFNB1*, *IFIT1* and *TNF* expression, as well as NFKBIA ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) phosphorylation at serine 32 (P-Ser32) to release NF- κ B inhibition. Conversely, GSK3 inhibition and CTNNB1 overexpression inhibited their induction. We also confirmed key observations in primary human cells, including NHBE epithelial cells, hepatocytes and MDM immune cells. A diminished IRF3-dependent and NF- κ B-dependent antiviral responses upon gene silencing or inhibitor-treated cells were observed in all cell types with the exception of MDM for which *TNF* gene is unaffected by GSK3 inhibitor treatment at early time points. This is unexpected as GSK3 is generally required for pro-inflammatory cytokine production in immune cells [492] and may reflect a differential regulation of the IRF3- and NF- κ B-dependent responses by a WNT pathway following RLR stimulation in MDM. Finally, in addition to SeV infection, the contribution of GSK3/CTNNB1 in feedback inhibition of innate immunity was further extended to HCV infection of primary human hepatocytes, suggesting a regulatory role in various types of viral infections. The activation of CTNNB1 in primary hepatocytes infected with HCV (**Figure II.6E**) was previously reported, and however was mediated by the release of CTNNB1 from the E-cadherin complex and not from activation of a Wnt signaling pathway [493]. In this study, activation of the AKT/CTNNB1 pathway with phosphorylation of CTNNB1 at Ser552 induces epithelia-mesenchymal-transition in HCV-infected hepatocytes [493]. Whether this could be exploited by HCV to decrease antiviral innate immune response and allow increased viral replication remains to be demonstrated. Nevertheless, this is strongly supported by the

knockdown of CTNNB1 that increases IFIT1 synthesis in HCV infected primary hepatocytes, while diminishing viral replication (**Figure II.6E-F**).

Previous studies have reported anti-inflammatory properties of GSK3 inhibitors [64, 398, 494-498] but few have suggested CTNNB1 as the effector protein [326, 328, 499, 500]. In addition, CTNNB1 has been involved in a GSK3-independent pathway through protein kinase C (PKC), AKT1 or LRRFIP1-dependent activation to positively or negatively regulate innate immunity [123, 330, 375, 501]. Yang *et al.* showed that CTNNB1 positively regulated *Listeria monocytogenes*-induced IFNB1 production in mouse macrophages via a MAVS-independent pathway, acting as a co-activator of IRF3 that promote recruitment of p300 to the IFNB1 enhanceosome. They found that LRRFIP1 interacts with CTNNB1 to promote phosphorylation of CTNNB1 at Ser552. In our study, the role of CTNNB1 as a feedback inhibitor (co-repressor) may be explained by differential post-translational modifications of CTNNB1, which upon activation of a canonical-like WNT pathway promote a negative regulation of the innate response by antagonizing IRF3 function. Our data showed that SeV-induced IRF3 interaction of CTNNB1 do not correlate with phosphorylation of Ser552. Whether this interaction is phosphorylation-dependent is unknown at this time but may involve regulation by other post-translational modifications such as PKC-dependent deacetylation of CTNNB1 at Lys49 by HDAC6 for its nuclear translocation and promoter binding [330]. Nevertheless, the activation of a canonical-like WNT/CTNNB1 pathway by virus infection must play its regulatory role in the late stage of IRF3 transcriptional activity in the infected cells via different scenario for a CTNNB1-IRF3 protein complex: import inhibition into the nucleus, increased nuclear export, increased protein degradation or as repressor of transcription. The effect of CTNNB1 as a negative regulator of IFNB1 could also

be explained by the observed negative regulation of the NF- κ B signaling pathway (**Figures II.3-6, II.S10 and II.S11**) and as previously reported [326]. Interestingly, the recent observation of the involvement of DDX3 in the activation of the WNT/CTNNB1 pathway [502] may also contribute to a negative regulation of IFNB1 by its recruitment to the plasma membrane and inhibition of its role in the RLR pathway through TBK1/IKBKE-mediated phosphorylation of IRF3 [231, 466].

Here, we demonstrate that pharmacological inhibition of GSK3 inhibited NF- κ B-mediated inflammation in response to viral infection, but more importantly that this inhibition extends to IRF3-mediated antiviral responses. Indeed, we confirm mechanistically that the inhibition is mediated through CTNNB1, since GSK3 inhibitor treatment, which induces accumulation of active CTNNB1 and abrogates antiviral responses, has almost no effect in CTNNB1 knockdown cells. The effect of CTNNB1 could be mediated directly through an interaction with IRF3 and p65 subunit of NF- κ B as observed in our co-immunoprecipitation experiments (**Figures II.7 and II.S12**). On the basis of these observations, we propose a novel role of a canonical-like WNT/CTNNB1 signaling pathway in a feedback inhibition of the antiviral innate immune response through regulation of IRF3- and NF- κ B-dependent transcription (see **Figure II.8**).

To our knowledge, there has been no comprehensive study describing a regulation of *IFNB1* expression by a canonical-like WNT signaling pathway. More importantly, we demonstrated for the first time the feedback inhibition of the RLR/MAVS/IRF3-mediated antiviral innate response by activation of WNT/CTNNB1 pathway induced upon viral infection. Our observations, combined with previously described role of mouse Wnt2 [483], Wnt3a [395] and *Drosophila melanogaster* WntD [482] in inflammatory response to bacterial infection, support

a novel role of a canonical-like WNT pathway in the regulation of innate immunity to control excessive response to pathogens, including virus infection as newly reported in this study. The sheer diversity of the 19 WNT proteins and the 10 FZD receptors suggests that other WNT genes could serve as pathogen specific regulators of innate immunity. Different WNT and FZD expression profiles in various cell types could control the specificity of WNT-mediated signaling, a mechanism that would be reminiscent of the extracellular pathogen sensing by TLRs [503]. In addition, WNT signaling present the advantage of being limited to the vicinity of the infection site, since WNT posttranslational modification by lipid adducts allows them to stick tightly to cells membranes and the extracellular matrix, limiting their diffusion to lateral spreading between adjacent cells [504, 505].

In summary, our genome-wide RNAi screen identified 114 highly prioritized human gene products potentially regulating virus-induced *IFNB1* expression. These genes acting either as positive or negative regulators upon silencing provide a functional validation of our RNAi data and identify novel regulators of *IFNB1* expression required to control virus infection and to prevent excessive activation in autoimmune diseases. Many genes of the WNT pathway (WNT2B, WNT9B, WLS and CTNNB1) are identified as negative regulators of RLR-mediated antiviral response upon gene silencing. WNT2B and WNT9B secretion in response to viral infection induce a CTNNB1-dependent signaling pathway leading to decreased magnitude of IFNB1 production and effector response in a feedback inhibition mechanism. Exploiting the actions of human encoded regulators of the innate immune response by developing immunomodulatory molecules presents an alternative strategy with a potential to treat a broad range of viral infection. In particular, the discovery of drugs that target canonical-

like WNT pathways may be therapeutically useful for limiting viral infection or virus-induced inflammation.

II.5 Materials and methods

Ethics statement

Primary human hepatocytes were purified by collagenase perfusion from normal biopsies obtained from healthy peritumoral liver tissues of patients undergoing partial hepatectomy for hepatic tumors [506]. Wedge samples (20–50 g) were flushed of blood and maintained overnight in a preservation solution (Belzer UW; Dupont Pharma, Mississauga, ON, Canada) at 4°C. At time of perfusion, a selected vein was cannulated with a tip to allow circulation of the buffers in the whole liver sample. All other surrounding veins were subsequently sealed with glue (Vetbond veterinary glue, 3M, London, Ontario, Canada) to allow good dispersion of the buffers and increase the pressure in the whole liver sample. Perfusion starts with calcium free HEPES buffer for 15 min at 20 ml/min following perfusion with 0.55 mg/ml type 2 collagenase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) and 1.65 mg/ml CaCl₂ for 30 min at 15 ml/min. At the end, liver was opened and cells washed in L-15 media. Viability was assessed by trypan blue exclusion. Cells were seeded at a 50 000 cells/cm² with William's E media supplemented with 10 % FBS. All procedures followed were in accordance with the ethical commission of the CHUM, Hôpital St-Luc, Montréal, Canada and with the Helsinki Declaration. Human monocyte-derived macrophages (MDM) were prepared from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) purified from whole blood of healthy donors by standard Ficoll (GE Sciences) gradient centrifugation. Monocytes were obtained from PBMC by plastic adherence (>97 % CD14⁺). Following extensive washes to remove lymphocytic non-adherent cells, adherent monocytes were allowed to differentiate into MDM for 5 days in

the presence of 50 ng/mL granulocyte-monocyte colony stimulating factor (M-CSF, R&D). The study was approved by the IRCM Research Ethic Review Board and in accordance with the Helsinki Declaration. Samples were collected after written informed consent had been obtained.

Expression vectors

WNT2B, *WNT9B*, *CTNNB1* cDNA were obtained from Open Biosystems. Following PCR-amplification, PCR products were cloned into pcDNA3.1-Hygro-MCS using EcoRV/HindIII [507]. All constructs were verified by nucleotide sequencing. pIFNB1-LUC, pISG56-LUC and p2xNF- κ B-LUC luciferase reporter constructs were previously described [508-510]. To generate stable 293T cells harboring the pIFNB1-LUC promoter, we replaced the MluI-BamHI fragment encompassing the CMV promoter of pcDNA3.1-hygro(+) with the MluI-BamHI fragment of IFN β -pGL3 [509], which includes two copy of the *IFNB1* promoter (-280/+20) and the firefly luciferase coding sequence. pEF1 α -LUC was generated after PCR amplification of the EF1 α promoter from pEF/JFH1-Rz/Neo [511] and cloning into pcDNA3.1_fLUC_hygro(+) using MluI and BamHI. HCV genotype 2a strain JFH1 p7(+) [511] and J6/JFH-1(p7-Rluc2A) [512] were previously described.

Cells lines and culture

HEK 293T (human embryonic kidney), Huh7 (human hepatoma) and HeLa (human epithelial carcinoma) cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Wisent). A549 (human lung adenocarcinoma epithelial) were cultured in Ham's F-12 medium (Invitrogen). Both media were supplemented with 10 % fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 2 mM glutamine (all from Wisent). Normal human bronchial epithelial cells (NHBE) were obtained from Lonza, cultured in BEGM medium

(Lonza) and used between passage 2 and 3. Cell populations of HEK 293T stably harbouring the pIFNB1-LUC and pEF1 α -LUC used in the screens were produced after selection with 200 μ g/ml of hygromycin B (Wisent). Transient transfections were performed with linear 25 kDa polyethylenimine (PEI) (Polysciences, Inc) at a 3 μ g PEI to 1 μ g DNA ratio for all plasmids and with lipofectamine 2000 (invitrogen) for polyI:C. siRNA ON-TARGETplus SMARTpool, Human CTNNB1 (1499) (Thermo Scientific) was transfected with lipofectamine RNAi max (Invitrogen) according to the reverse transfection manufacturer protocol for 72 hours. GSK3 inhibitors BIO (GSK3 inhibitor IX, Sigma) and BIO-acetoxime (GSK3 inhibitor X, EMD Millipore) and inhibitor of TCF/LEF interaction PNU74654 (TOCRIS) were added for 16 hours at the indicated concentrations in 0.5 % DMSO.

Lentiviral shRNA library production

MISSION TRC shRNA lentiviral library containing ~75,000 individual clones representing ~15,000 genes was purchased from Sigma-Aldrich. Three individual clones per gene were chosen for lentiviral production, covering different regions of the gene sequence. For the genome-wide production of lentiviral particles, HEK293 cells (2×10^4) were plated one day before the transfection. All transfections were performed using a Biomek FX (Beckman Coulter) enclosed in a class II cabinet according to MISSION Lentiviral Packaging Mix protocol (SHP001). As control the MISSION shRNA NT clone (Sigma SHC002) was included in each 96-well plates. The lentivirus-containing supernatants were collected at 24 and 48 hours post-transfection and pooled. NT shRNA controls and 4 % of random samples of each plate were used to measure lentiviral titers for quality control purposes. Titers were determined by limiting dilution assay using HeLa cells. The samples (20 μ l) were serially diluted in complete DMEM containing 8 μ g/ml of hexadimethrine bromide (Polybrene from

Sigma). Dilutions (1:400 or 1:10,000) were added to preparation of HeLa cells and media were changed at day 3 and 5 with complete DMEM containing 1 µg/ml of puromycin (Wisent). After four days with the selective agent, cells were stained with 1.25 % crystal violet and counted in plaque-forming units (PFU) allowing the lentiviral titer determination.

Genome-wide shRNA screen

Cells were seeded in white 96-well plates at a density of 5,000 293T pIFNB1_LUC and 1,250 293T pEF1α-LUC in 100 µl of complete phenol-red free DMEM containing 4 µg/ml polybrene. Infection with lentivirus encoding shRNA (pool of three shRNAs for the primary screen and five individual shRNAs for secondary screens) were carried out immediately after cell seeding at a multiplicity of infection (MOI) of 5 and incubated for four days at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂. Cells were infected with 100 HAU/ml of SeV (Cantell Strain, Charles River Labs) for 16 hours before cell lysis and firefly luminescence reading in 100 mM Tris acetate, 20 mM Mg acetate, 2 mM EGTA, 3.6 mM ATP, 1 % Brij 58, 0.7 % β-mercaptoethanol and 45 µg/ml luciferine pH 7.9 buffer. All infections were performed using a Biomek FX (Beckman Coulter) enclosed in a class II cabinet.

Large-scale lentiviral shRNA production

293T cells were transfected using PEI with 6 µg pLKO.1-puro encoding shRNA targeting WNT2B (TRCN0000033376 and TRCN0000033377), WNT9B (TRCN0000062069 and TRCN0000062070), WLS (TRCN0000133858 and TRCN0000133999), CTNNB1 (TRCN0000003843, TRCN0000003844 and TRCN0000003845) or shRNA non-target (NT, Sigma), 1.5 µg pMDLg/pRRE, 1.5 µg pRSV-REV and 3 µg pVSVg as previously described [513]. After 48 hours, medium containing lentiviral vector was harvested and cellular debris

were removed by filtration (0.45 μ m). Titers were determined by limiting dilution assay using HeLa cells, as described above.

High-throughput qRT-PCR assay

For the shRNA validation screen, total RNA was extracted in 96-well plate format using “RNAqueous – 96 automated” kit (Ambion) with a Multimek-96 (Beckman Coulter). RNA concentrations were measured using Ribogreen reagent (Invitrogen) on the Envision plate reader (Perkin Elmer). After normalisation of RNA at 200ng/well, reverse transcription reactions were performed with a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR assays were designed following the Universal Probes Library (UPL) from Roche. The best primer/probe combinations were calculated online with the ProbeFinder assay design software. qPCR reactions were performed in 384-well plates using 2 μ l of cDNA samples, 5 μ l of the Light Cycler 480 Probes Master (Roche), 1 μ M of gene specific primers (IDT) and 2 μ M of the matching UPL probe in a total of 10 μ l (supplementary Table 3 for the complete list of primers and probes used). Amplification conditions on the Light Cycler 480 (Roche) for the UPL were initial denaturation of 5 minutes at 95 °C followed by 45 cycles of 10 seconds at 95 °C, 30 seconds at 60 °C and 1 second at 72 °C. All qPCR were run in duplicates and the relative quantification of mRNAs from the *IFNBI* and shRNA targeted genes was determined with the average of Ct (cycle threshold) using the $\Delta\Delta$ Ct method. Briefly, the difference in the cycle threshold (Δ Ct) value was determined by subtracting the Ct value for the transcripts of interest, from the Ct value of the endogenous control (*ACTB*: β -actin) and compared with a shRNA NT calibrator: $\Delta\Delta$ CT = Δ Ct_{Sample} – Δ Ct_{Calibrator}. Relative expression (RQ) was calculated using the Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 software (Applied Biosystems) and the formula $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$. A second set of

primers and probe were designed for genes for which no amplification was obtained in the first round of qPCR (supplementary Table 3). A not determined (nd) note is indicated when no results were available after two rounds of qPCR (supplementary Table 1).

Large-scale RNA extraction and qRT-PCR

Total cellular RNA was extracted with the RNeasy Mini kit (Qiagen). Reverse transcription was performed on 500 ng total cellular RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, see (supplementary Table 4 for the list of primers and probes). PCR reactions were performed using 1.5 µl of cDNA samples (15 ng), 5 µl of the Fast TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems), 10 pmol of each primer (IDT) and 5 pmol of the UPL probe (Roche) in a total volume of 10 µl. The ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification level and was programmed to an initial step of 3 minutes at 95 °C, followed by 40 cycles of 5 seconds at 95 °C, 30 seconds at 60 °C and 1 second at 72 °C. All reactions were run in triplicate on biological duplicate and the average values were used for quantification. *ACTIN* and *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) were used as endogenous controls. The relative quantification of target genes was determined by using the $\Delta\Delta C_t$ method, as described above.

Immunofluorescence analysis

HEK 293T cells were seeded in cover slip-containing 24-well plates. Twenty-four hours later, cells were infected with SeV for 16 hours before being washed twice with PBS, fixed with 4 % paraformaldehyde-containing PBS during 20 minutes at room temperature and then permeabilized in 0.2 % Triton X-100/PBS during 15 minutes. Blocking was made in PBS with 10 % normal goat serum, 5 % bovine serum albumin (BSA) and 0.02 % sodium azide during 45 minutes at room temperature. Following three rapid washes, cells were labelled with mouse

anti-CTNNB1 active (Millipore) and rabbit anti-IRF3 (IBL) primary antibodies diluted in 5 % BSA/0.02 % sodium azide/PBS during 2 hours. Slides were washed three times in PBS and then labelled with anti-mouse AlexaFluor 488 and anti-rabbit AlexaFluor 546 secondary antibodies (Invitrogen) diluted in 5 % BSA/0.02 % sodium azide/PBS during 1 hour. Cells were extensively washed and incubated with Hoechst dye (Invitrogen) at a final concentration of 1 µg/mL in PBS. Following three rapid washes, slides were mounted using DABCO (Sigma-Aldrich) as an anti-fading agent. Labelled cells were then examined by laser scanning microscopy using a LSM510 confocal microscope (Zeiss).

Microarray analysis

The microarray studies were performed with HEK 293T cells infected for 16 hours with SeV (100 HAU/ml) or treated for 16 hours with a mixture of IFN- α from human leukocytes (400 U/ml; Sigma) and with untreated cells as control. A total of 10 µg of RNA was reverse transcribed using oligo(dT) 16-18 primers and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Following purification using QIAquick PCR Purification kit (Qiagen), up to 1 µg of purified cDNA was mixed with 5'-Cy3 labeled random nonamers (Trilink Biotechnology) and heated at 95 °C for 10 minutes and transferred on ice for 10 minutes. Samples were mixed with 1 mM dNTP and 2 µl of 3'-5' exo-Klenow fragment (New England Biolabs) and incubated at 37 °C for 2 hours. The labeling reaction was stopped using 50 µM EDTA and the DNA precipitated using 0.5 M NaCl and 1 volume isopropanol, washed with 80 % ethanol and resuspended in water. Hybridizations were carried out using the Human GE 4x44K v2 Microarrays (Agilent Technologies) containing probes targeting 27,958 Entrez Gene RNAs. Arrays were scanned at 5 µm resolution using a GenePix4000B scanner (Molecular Devices). Data from scanned images

were extracted using GenePix 6.1 (Axon) and processed and normalized using ArrayPipe (v2.0). Processed data was used as input for linear modeling using Bioconductor's **limma package**, which estimates the fold-change between predefined groups by fitting a linear model and using an empirical Bayes method to moderate standard errors of the estimated log-fold changes in expression values from each probe set. *P* values from the resulting comparison were adjusted for multiple testing according to the method of Benjamini and Hochberg.

Western immunoblot analysis

Cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS; Wisent), harvested and lysed in 10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 0.5 % Triton X-100, pH7.6 with EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Cell lysates were clarified by centrifugation at 13,000 g for 20 min at 4 °C and subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Western blot analysis was performed using mouse anti-WNT2B (Santa Cruz), anti-ACTIN (Chemicon International), anti-CTNNB1 active (Millipore), anti-FLAG (Sigma), anti-IRF3 (Santa Cruz), anti-NS3 (HCV, Abcam), anti-p65 (Santa Cruz) and rabbit anti-CTNNB1 total (Epitomics), anti-CTNNB1-P-Ser552 (Cell Signaling), anti-IFIT2 (Novus Biologicals), anti-IFIT1 (Novus Biologicals), anti-SeV (HN) [first described by Ilkka Julkunen 514], anti-WNT9B (Aviva systems biology) and anti-NFKBIA-P-Ser32 (Cell Signaling). HRP-conjugated secondary antibodies were from Bio-Rad. The chemiluminescence reaction was performed using the Western Lighting Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer).

Luciferase assay

293T cell population stably expressing pIFNB1-LUC were cultured in white opaque 96-well plates with complete phenol red-free DMEM and transfected with 1 ng of Rluc expressing plasmid used to normalized the firefly luciferase readout. For the other fLUC reporter

constructs, 293T cells were transfected with 20 ng of M50 Super 8xTOP-flash [488] (Addgene plasmid 12456), pIFNB1-LUC, pISG56-LUC or p2xNF- κ B-LUC and 1 ng of Rluc. Cells were lysed directly and luciferase activities were determined by a dual-luciferase reporter assay system (Promega).

SeV, HCV and IFN- α and purified WNT stimulations

Cells were infected with 100 HAU/ml of Sendai virus (Cantell Strain, Charles River Labs) or stimulated with mixture of IFN- α from human leukocytes (400 U/ml; Sigma) for 4 hours in A549 cells and MDM, 5 hours in human primary hepatocytes and 16 hours in 293T, Huh7 and HeLa cells before luminescence reading, immunoblot analysis or qRT-PCR. Primary human hepatocytes were infected for 48 hours with HCV genotype 2a strain JFH1 p7(+) and Huh7 cells were infected for 96 hours with J6/JFH-1(p7-Rluc2A). HCV particles were produced as previously described [490]. Purified WNT9B and WNT3A proteins (R&D systems) were reconstituted at 100 μ g/ml in PBS containing 0.1 % BSA and added to SeV-infected HEK 293T cell supernatant for 16 hours.

IFN- β ELISA

Secreted IFN- β protein quantification was measure with *VeriKine* Human IFN- α Serum Sample ELISA Kit (PBL Interferon Source) using 50 μ l of HEK 293T cells supernatant previously transduced with lentivirus-expressing shRNAs for three days before infection with SeV for 16 hours.

Statistical analyses

Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance for comparison of two means was assessed by an unpaired Student's t test. Analyses were

performed using the Prism 5 software (GraphPad). Statistical relevance was evaluated using the following p values: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***).

II.6 Supporting information

II.6.1 Supplemental figures

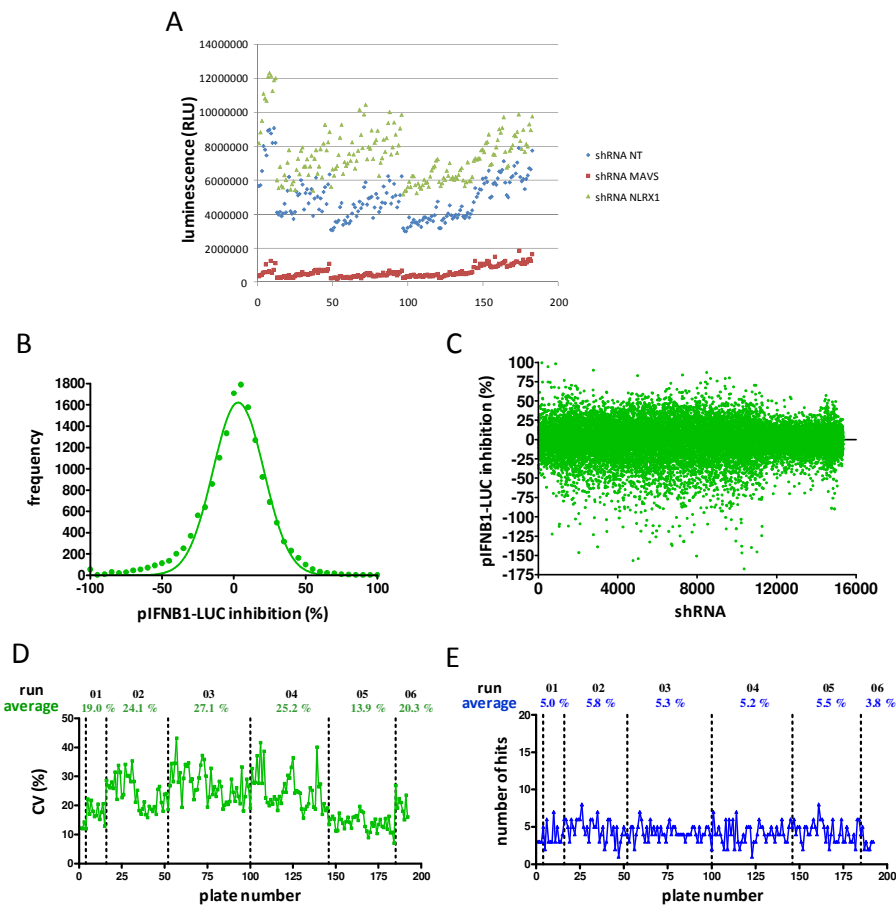


Figure II.S1: Statistical analysis of the genome-wide gene silencing study of virus-induced innate immune responses. (A) Average luminescence determination of control shRNAs (NT, MAVS_45 and NLRX1_46) on IFNB1 promoter-driven luciferase activity that were incorporated in each 96-well plate of the genome-wide screen. (B) Gaussian distribution of all individual IFNB1 promoter-driven luciferase data points of the genome-wide screen in percentage inhibition of control shRNA NT. (C) Individual IFNB1 promoter-driven luciferase data points of shRNA targeting 15,357 human genes in percentage inhibition of control shRNA NT. (D) Coefficient of variation (CV) of each 96-well plate in the primary screen.

Dotted lines delimitate six different screening campaigns (run 1–6) for completion of the primary screen. The average CV for each screening campaign is indicated (green). (E) Number of hits selected per tested plate using the strictly standardized mean difference (SSMD) as a cutoff ($SSMD \leq -1.314$ and $SSMD \geq 1.662$). Dotted lines delimitate six different screening campaigns (run 1–6) for completion of the primary screen. The average hit rate for each screening campaign is indicated (blue).

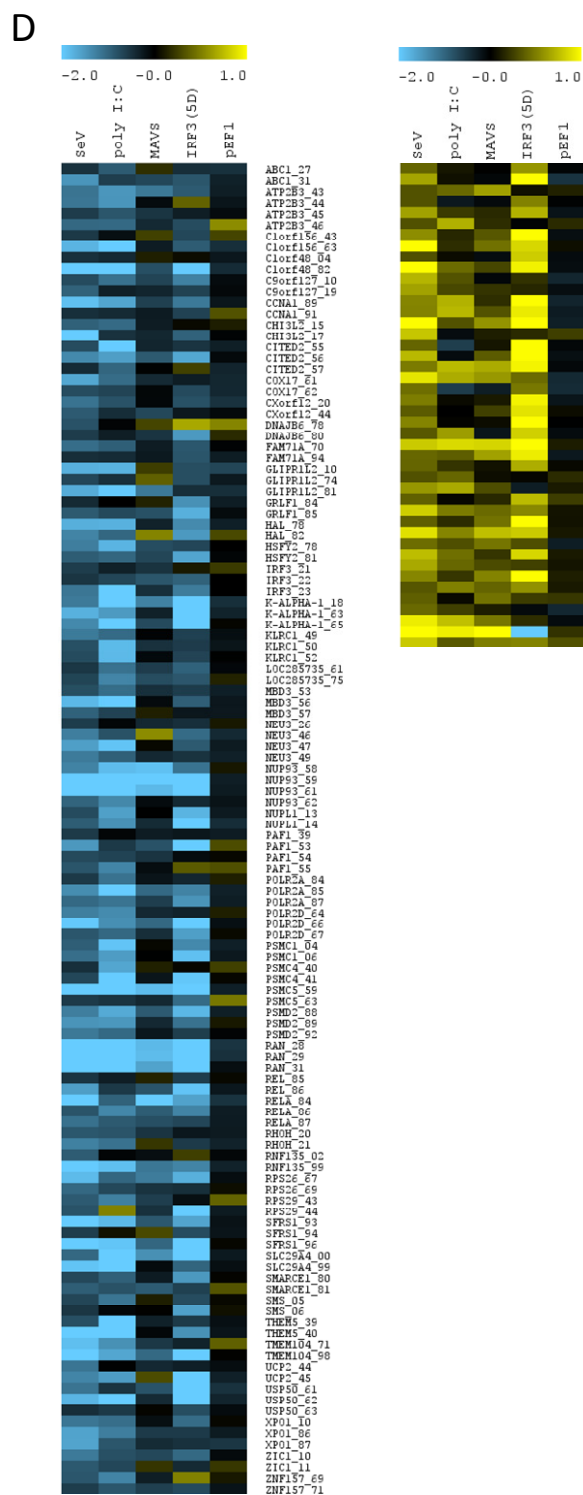
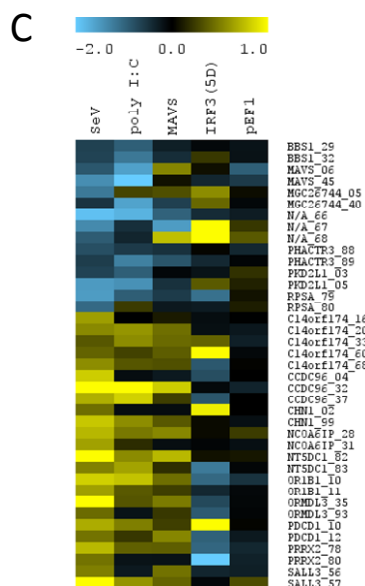
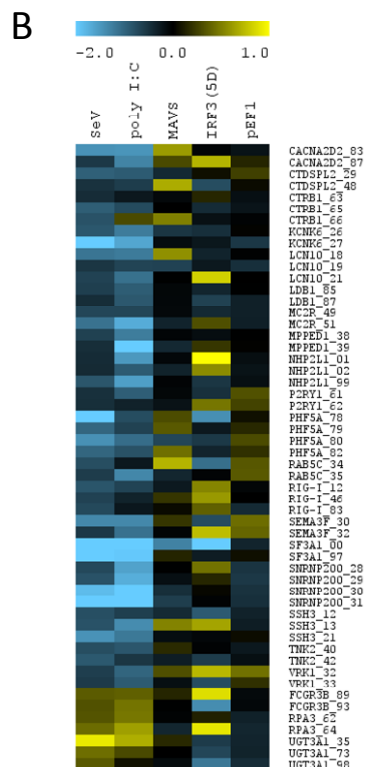
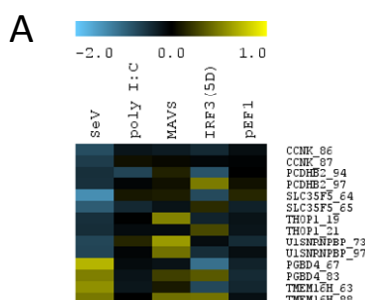


Figure II.S2: Functional profiling data of the 114 gene hits identified as potential regulators of antiviral innate responses and classified within the four functional groups. Data are represented as heat map indicating \log_2 effect of silencing each gene hit in secondary assays. Positive regulators are depicted in blue and negative regulators are depicted in yellow. Manual clustering was performed for each gene hit confirmed with at least two shRNAs in SeV confirmation screen and validated with endogenous *IFNB1* mRNA quantification by classification into one of the four functional groups: (A) SeV specific; (B) Cytoplasmic dsRNA sensing; (C) MAVS-dependent signaling; (D) Nuclear import or transcription factor-dependent process.

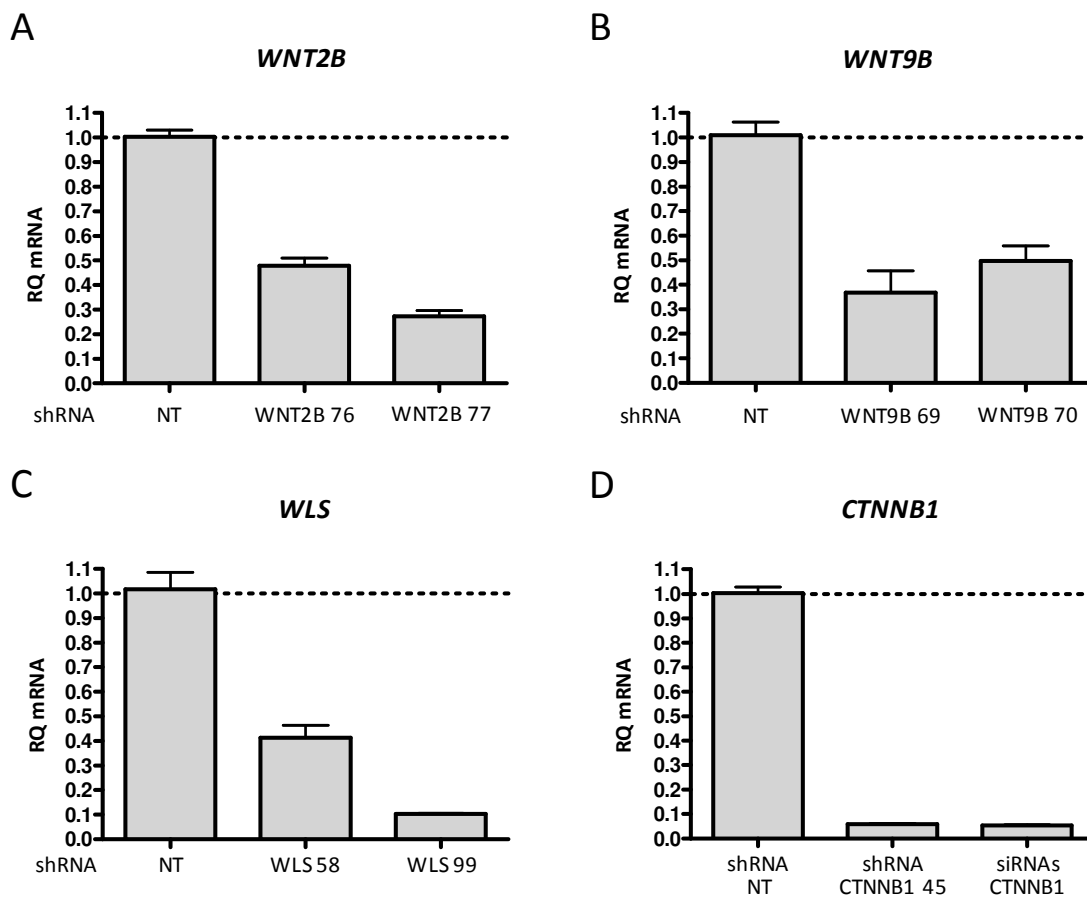


Figure II.S3: Validation of the knockdown efficiency of shRNAs and siRNAs used in this study. (A–D) *WNT2B* (A), *WNT9B* (B), *WLS* (C) and *CTNNB1* (D) mRNA levels in HEK 293T cells transduced with two-independent shRNAs per gene for four days. qRT-PCR determination represents the average mRNA RQ normalized versus ACTIN and HPRT1 mRNA

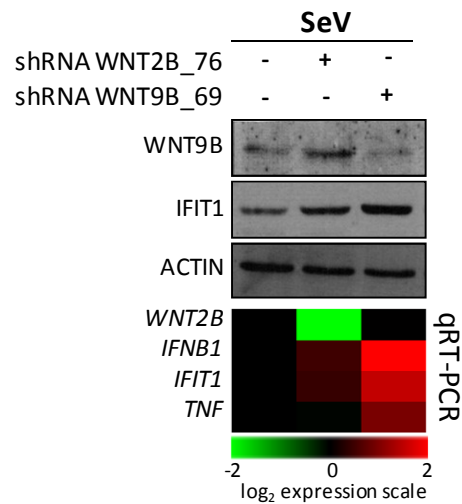


Figure II.S4: WNT2B and WNT9B ligands as novel negative regulators of antiviral innate immunity. Immunoblot analysis of WNT9B and IFIT1 (top), and qRT-PCR determination of *WNT2B*, *IFNB1*, *IFIT1* and *TNF* mRNA levels (bottom) in WNT2B or WNT9B knockdown HEK 293T cells following infection with SeV. Heat map data are log₂ scale of the average mRNA RQ normalized versus ACTIN and HPRT1 mRNA.

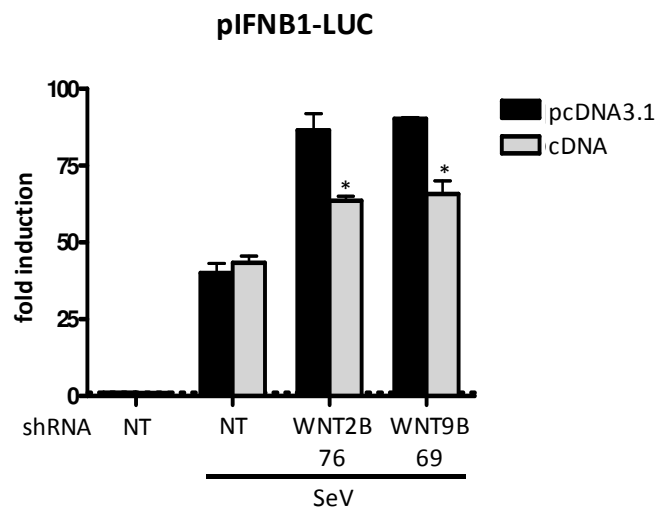


Figure II.S5: WNT2B and WNT9B knockdown phenotype can be rescued by expression of the corresponding cDNA harboring silent mutations to render it resistant to RNAi degradation. Fold induction of *IFNB1* promoter-driven luciferase activity in WNT2B and WNT9B knockdown HEK 293T cells following infection with SeV for 16 hours transfection. Knockdown cells were transfected with an empty expression vector (pcDNA3.1) or WNT2B

and WNT9B immune to RNAi expression vectors for 48 hours. *P* values<0.05 (*) are indicated.

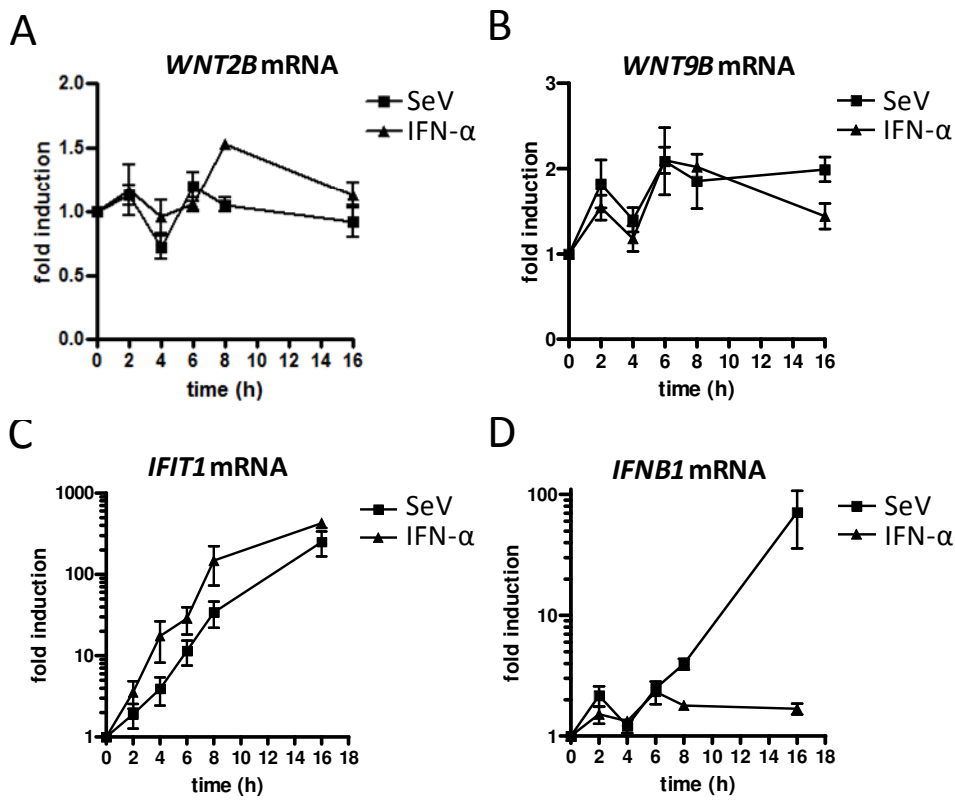


Figure ILS6: WNT2B and WNT9B are not induced following SeV infection or IFN-α treatment. (A–D) Kinetic studies of SeV infection and IFN-α treatment on gene transcription of *WNT2B* (A), *WNT9B* (B), and representative effector genes *IFIT1* (C) and *IFNB1* (D) by qRT-PCR quantification of mRNA levels in HEK 293T cells.

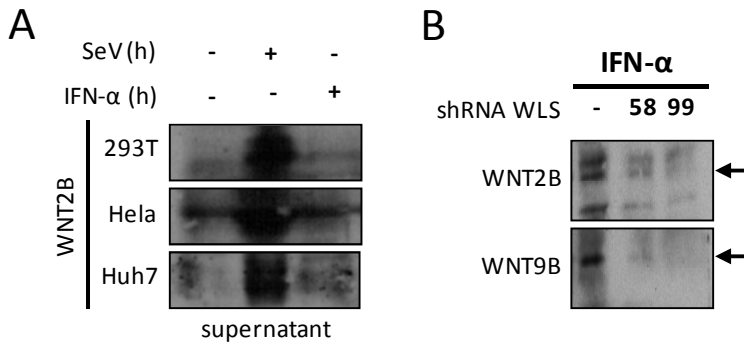


Figure ILS7: WNT2B and WNT9B secretion in various cell lines and in WLS knockdown cells. (A) Immunoblot analysis of WNT2B secretion in supernatants of HEK

293T, HeLa and Huh7 cells following a 16 hours SeV infection or IFN- α treatment. (B) Immunoblot analysis of WNT2B and WNT9B secretion in supernatants of HEK 293T treated with shRNA targeting WLS for four days and subjected to IFN- α treatment for 8 hours.

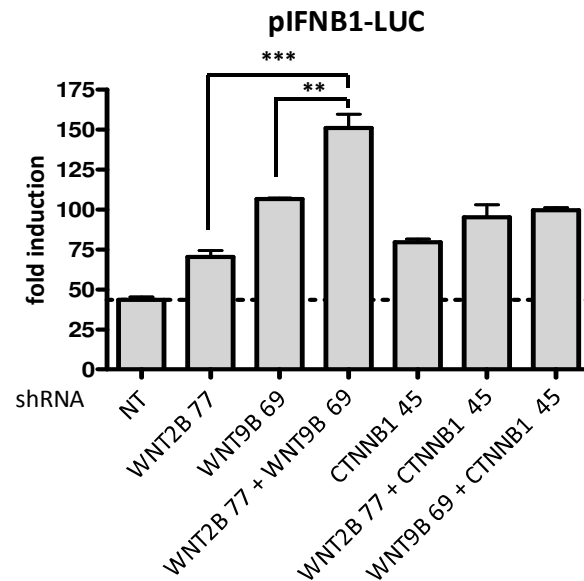


Figure II.S8: WNT2B and WNT9B knockdown phenotype on innate antiviral immunity are additive. Fold induction of *IFNB1* promoter-driven luciferase activity in single or double knockdown WNT2B, WNT9B and CTNNB1 HEK 293T cells following infection with SeV for 16 hours. Cells were transduced with a mixture of shRNA NT (MOI=5) and targeted gene shRNA (MOI=5) for single knockdown and a mixture of two targeted gene shRNAs (MOI=5 for each one) for double knockdown, to maintain a MOI=10 in all conditions. *P* values <0.01 (**) or <0.001 (***) are indicated.

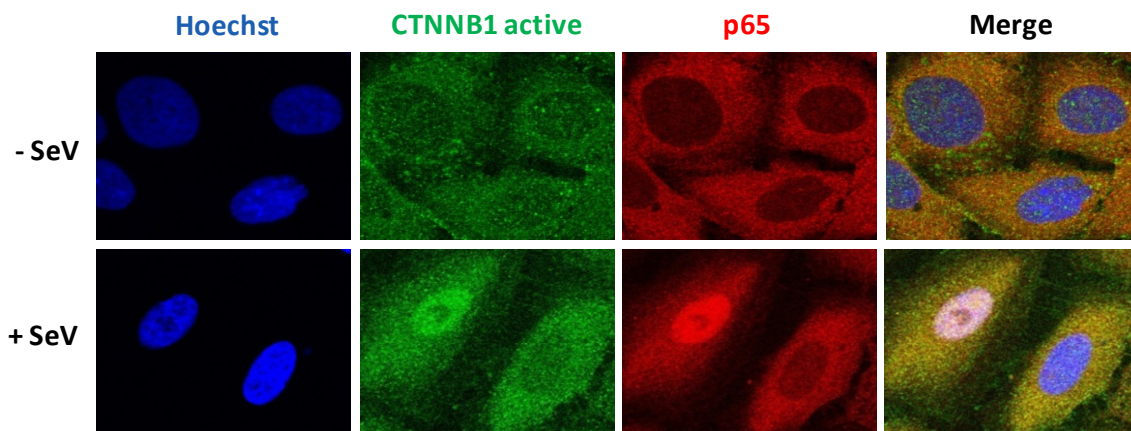


Figure II.S9 : SeV infection induces CTNNB1 nuclear translocation. Confocal analysis of A549 cells using Hoechst, anti-CTNNB1 active form and anti-p65 antibodies without virus infection or following 6 hours infection with SeV.

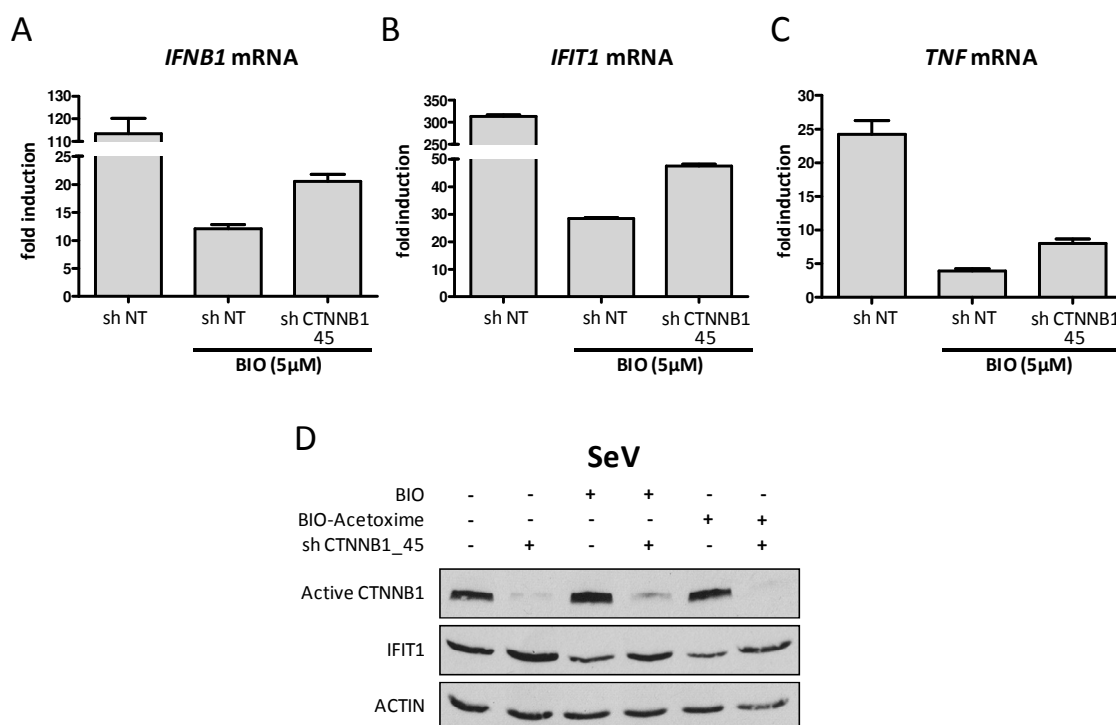


Figure II.S10: Effect of GSK3 inhibition on transcriptional activity of representative genes of innate immunity in CTNNB1 knockdown HEK 293T cells - Immunoblot analysis of CTNNB1 knockdown and GSK3 inhibitor-treated A549 cells. (A–C) qRT-PCR quantification of *IFNB1*(A), *IFIT1* (B) and *TNF* (C) mRNA levels in HEK 293T transduced with lentivirus-expressing shRNA NT (control) or shRNA 45 targeting *CTNNB1* for four days and subjected to SeV infection and treatment with GSK3 inhibitor BIO (5 μM) for 16 hours. qRT-PCR determination represents the average mRNA RQ normalized versus ACTIN and HPRT1 mRNA. (D) Immunoblot analysis of dephosphorylated active CTNNB1 at Ser37/Thr41 and IFIT1 in A549 cells transduced with lentivirus-expressing shRNA NT (control) or shRNA 45 targeting *CTNNB1* for four days and subjected to treatment with GSK3 inhibitors BIO (5 μM) or BIO-acetoxime (10 μM) and SeV infection for 6 hours.

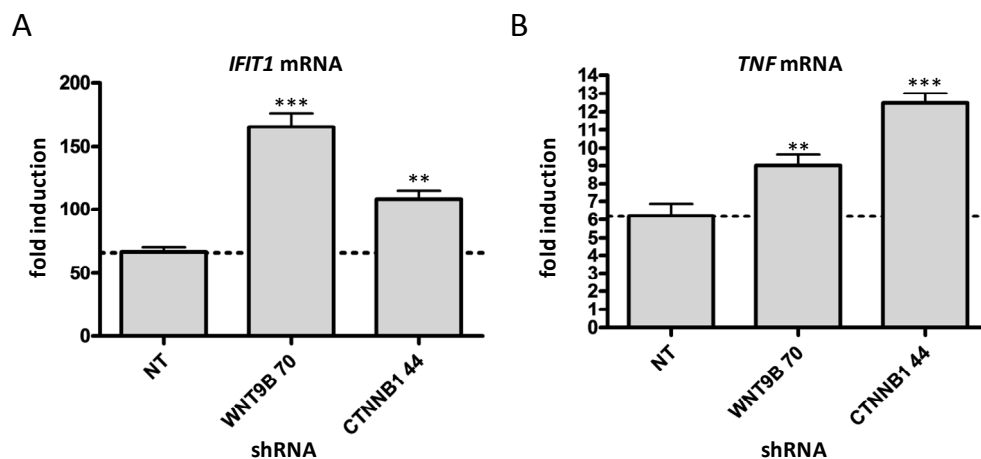


Figure ILS11: WNT/GSK3/CTNNB1 signaling acts as a negative regulator of innate immune response in primary human hepatocytes infected with SeV. Fold induction of *IFIT1* (A) and *TNF* (B) mRNAs in primary human hepatocytes transduced with lentivirus-expressing shRNA NT, shRNA WNT9B 70 or shRNA CTNNB1 44 for four days and subjected SeV infection for 5 hours. qRT-PCR determination represents the average mRNA RQ normalized versus ACTIN and HPRT1 mRNA. *P* values <0.01 (**) or <0.001 (***) are indicated.

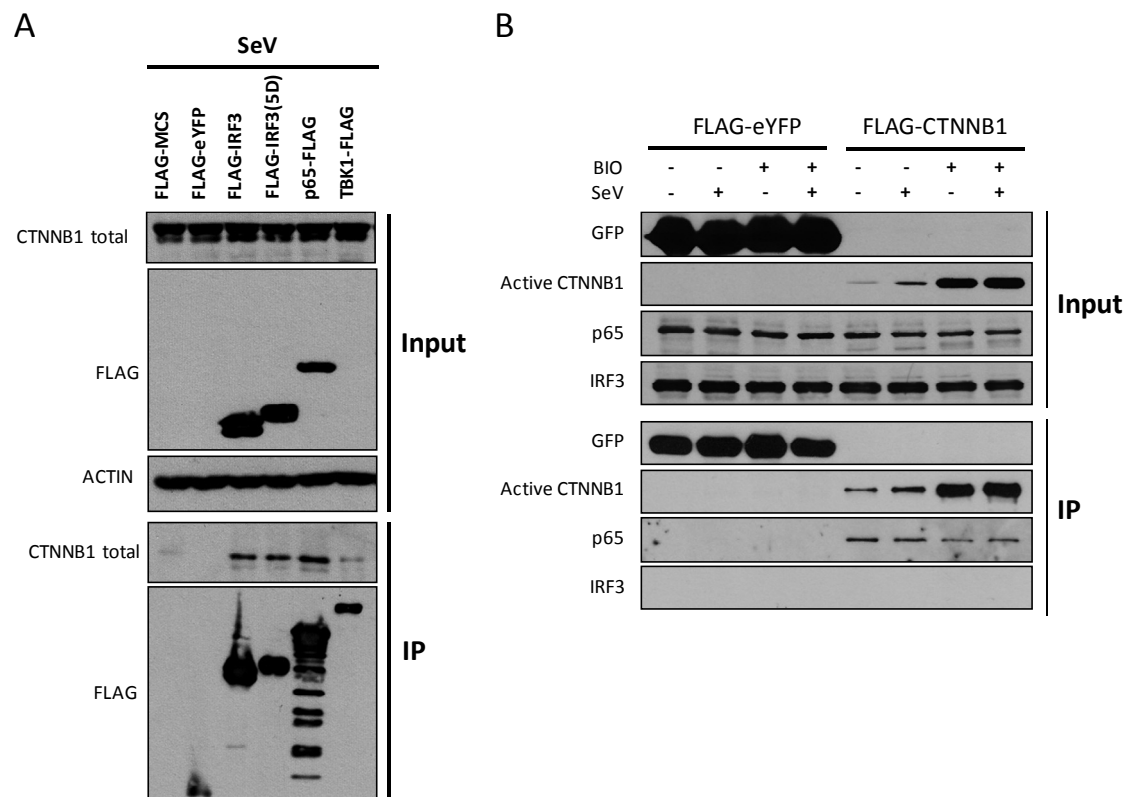


Figure II.S12: CTNNB1 associates with IRF3 and NF- κ B subunit p65. (A) HEK 293T cells were co-transfected with CTNNB1 and FLAG-MCS (control), FLAG-eYFP (control), FLAG-IRF3, FLAG-IRF3(5D) p65-FLAG or TBK1-FLAG expressing plasmids for forty-eight hours. Cell extracts were prepared following infection with SeV for 16 hours before being subjected to immunoprecipitation directed against FLAG. Immune complexes were analyzed by Western blotting using anti-FLAG and anti-CTNNB1 antibodies. (B) HEK 293T cells were transfected with FLAG-eYFP (control) or FLAG-CTNNB1 expressing plasmids for forty-eight hours. Cell extracts were prepared following 16 hours of treatment with GSK3 inhibitor BIO (5 μ M), SeV infection or both before being subjected to immunoprecipitation directed against FLAG. Immune complexes were analyzed by Western blotting using anti-FLAG and anti-p65 and anti-IRF3 antibodies.

II.6.2 Supplemental tables

Table II. S1. Summary of gene silencing screening data.

Available at <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003416.s013>

Table II.S2. Venn diagram overlaps

Available at <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003416.s014>

Table II.S3. Oligonucleotide sequences and UPL probe used for HTS qRT-PCR.

Available at <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003416.s015>

Table II.S4. Oligonucleotide sequences and UPL probe used for qRT-PCR.

Available at <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003416.s016>

II.7 Acknowledgements

We thank P. Chagnon, S. Drouin, R. Lambert, C. Paradis and M. Arteau at IRIC's Genomics Core facility for qRT-PCR and microarray analysis; P. Gendron at IRIC's Bioinformatics Core Facility; Christian Charbonneau at IRIC's Bio-Imagery Core Facility for confocal microscopy; Jake Liang (NIDDK, National Institutes of Health) for pEF/JFH1-Rz/Neo plasmid; Takaji

Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo), Charles Rice (Rockefeller University) and Apath LLC for the use of JFH-1, for Huh7.5 cells and J6-JFH-1(p7-Rluc2a) reporter virus. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR-MOP-115010 and CIHR-CI6-103135), by a Sigma/Aldrich, Génome Québec (PRIVAC initiative) and by the Novartis/Canadian Liver Foundation Hepatology Research Chair to DL. MB was a recipient of the CIHR Postdoctoral Fellowship.

Chapitre III

III. L'étude de l'interactome de la CTNNB1 suite à l'infection par le VS a identifié de nouveaux régulateurs de l'immunité antivirale

III.1 Introduction et mise en contexte

Le premier travail présenté dans cette thèse décrit le criblage aux ARNis réalisé dans notre laboratoire et qui a permis l'identification de centaines de régulateurs potentiels de l'expression d'IFNB1. Dans cette thèse, nous avons principalement décrit la caractérisation d'un nouveau rôle des ligands WNTs et de leur protéine effectrice la CTNNB1 dans la modulation négative de l'immunité antivirale innée.

Il n'y a pas le moindre doute que les études entreprises sur la CTNNB1 au fil des années ont fourni un aperçu sans précédent sur les mécanismes de régulation de cette protéine principalement dans des contextes physio-pathologiques. Toutefois, un nombre limité d'études décrit son implication dans la régulation de l'immunité anti-virale innée. Plusieurs de ces études décrivent la CTNNB1 comme un activateur transcriptionnel de l'IFNB1 [123, 330, 331]. Quelques mécanismes moléculaires ont été proposés pour expliquer l'action positive de la CTNNB1 sur la transcription d'IFNB1 suite à l'infection virale. Parmi lesquels on retrouve des MPTs telles que la phosphorylation (Gantner, Jin et al. 2012) [331, 404] et la déacétylation [330]. Contrairement à ces études, nos travaux ont établi un rôle de régulateur négatif de la CTNNB1 et des inhibiteurs de GSK3 sur la production d'IFNB1, d'ISGs et de TNF α suite à l'infection par des virus à ARN comme le VS et le VHC. Toutefois, la cinétique et le mécanisme moléculaire qui permettent à la CTNNB1 d'exercer un rôle négatif dans la régulation de l'immunité antivirale innée demeurent inconnus. Néanmoins, nos résultats

préliminaires démontrent que les niveaux protéiques de la CTNNB1 augmentent rapidement lors de l'infection par le VS supposant une stabilisation de la protéine. De plus, nous avons observé que la CTNNB1 co-localise avec IRF3 et avec la sous-unité p65 de NF- κ B dans le noyau des cellules infectées par le VS, supposant une translocation nucléaire induite par l'infection. Et finalement, on observe une interaction entre la CTNNB1 et IRF3 qui est dépendante de l'infection virale, et une interaction constitutive avec p65.

En partant de ces observations nous avons établi les hypothèses suivantes :

-L'infection par des virus à ARN induit la sécrétion de ligands WNTs spécifiques, stabilise un pool de la CTNNB1 de cellules infectées qui produisent l'IFNB1, permet la translocation nucléaire d'une forme moléculaire qui interagit avec IRF3 et p65 (sans interagir avec TCF-LEF dans le cas de VS), et contribue à une rétro-inhibition de la production d'IFNB1 et de la réponse IFN de type I précoce lors du contrôle de la réponse immunitaire innée.

-L'infection induit un nouveau réseau d'interactions protéiques de la CTNNB1 au niveau des cellules infectées, qui régule négativement l'activité des facteurs transcriptionnels (p50/p65, IRF3/7 ATF-2/c-Jun, STAT1/2 etc) régulant ainsi l'expression de gènes de la réponse immunitaire innée tels que l'IFNB1, ISGs et gènes dépendant de NF- κ B (cytokine, TNF α etc).

Afin de vérifier ces hypothèses, il devient impérativement nécessaire d'explorer les mécanismes responsables de cette régulation par l'identification de partenaires de la CTNNB1 suite à l'infection virale. Ainsi, nous avons entrepris une étude de protéomique afin d'identifier l'interactome de la CTNNB1 suite à l'infection par le VS ou au traitement par des inhibiteurs de GSK3, et de focaliser sur les variations du taux d'interaction protéine-protéine. Ce chapitre décrit l'identification et la modulation des partenaires de la CTNNB1 obtenus par

spectrométrie de masse, suite à l'expression ectopique de la CTNNB1 en fusion avec une séquence étiquette 3X-FLAG, dans des cellules infectées au VS versus des cellules non infectées utilisées comme contrôles.

III.2 Méthodologie

L'approche expérimentale est similaire à celle décrite dans l'article 2 (chapitre 4) à l'exception de l'infection par le VS permettant l'étude de la modulation et du réseau d'interactions protéiques de la CTNNB1 dans des cellules infectées. Ainsi, les conditions d'immunoprécipitation testées pour la spectrométrie de masse sont la surexpression des deux plasmides contrôles pcDNA3.1_FLAG-MCS et pcDNA3.1_FLAG-eYFP ou de pcDNA3.1_3XFLAG-CTNNB1 avec ou sans infection par le VS (20h).

III.3 Résultats

III.3.1 Identification de l'interactome de la CTNNB1 de cellules infectées au VS

La technique de quantification de la spectrométrie de masse sans marquage (label free) a été utilisée afin de déterminer l'abondance de chaque protéine à travers les conditions et les réplicats. À partir de trois expériences indépendantes, les données ont été regroupées afin de comparer et quantifier la présence d'une protéine associée à la CTNNB1 dans les différentes conditions d'immunoprécipitation. L'analyse LC-MS/MS a permis l'identification au total de 5037 peptides uniques appartenant à 1129 protéines, dont 592 protéines ont été détectées avec au moins deux peptides par protéine dans les différentes expériences (**Annexe I.1**). La proportion de toute protéine individuelle dans chacune des quatre conditions a été déterminée de telle sorte que la somme des ratios soit égale à 1 (**Figure III.1**).

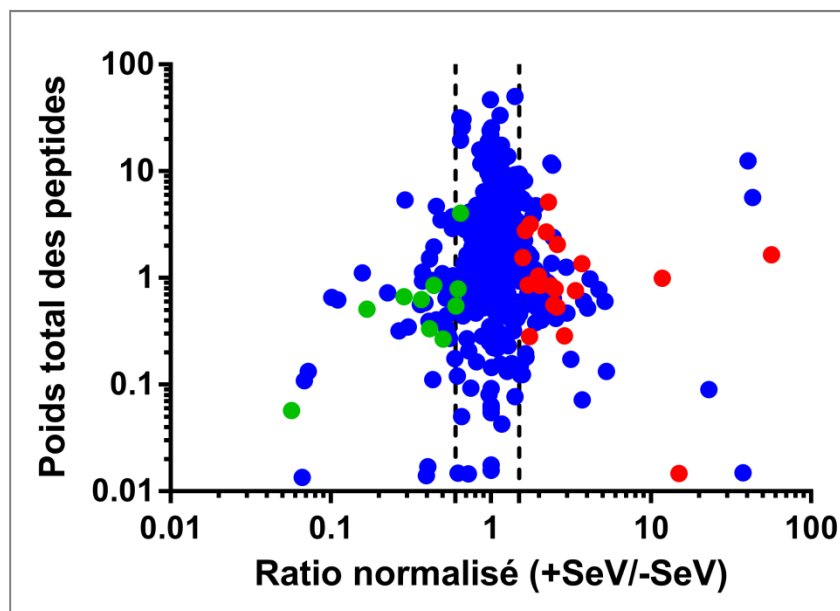


Figure III.1: Interactome de la CTNNB1 suite à l'infection par le VS. Nuage de points (scatter plot) représentant les ratios normalisés des 592 protéines identifiées par rapport à l'intensité des poids des peptides. Les protéines dissociées du complexe FLAG-CTNNB1 suite à l'infection par SeV (Ratio +SeV/-SeV < 0.6) sont colorées en vert et les protéines qui s'associent avec le complexe FLAG-CTNNB1 (Ratio +SeV/-SeV > 1.5) sont colorées en rouge.

Ce calcul a permis d'établir un facteur d'enrichissement, ainsi nous avons sélectionné d'abord les protéines dont la somme des ratios des deux conditions de contrôle (Flag-MCS, Flag-eYFP) ne dépasse pas 0.4. Ce premier calcul a permis l'identification de 441 interactants spécifiques.

Parmi ces interactants, 42 ont été détectés dans au moins deux expériences indépendantes et ont été alors sélectionnés comme interactants très spécifiques de la CTNNB1. Afin d'identifier les partenaires dont l'interaction est modulée par le VS, nous avons calculé pour chaque interactant spécifique le ratio entre les quantités détectées dans les conditions d'immunoprécipitation de Flag-CTNNB1 dans des cellules infectées et non infectées au VS. Le ratio de 1.5 a été sélectionné comme seuil minimal pour les protéines interagissant plus

spécifiquement avec la CTNNB1 tandis qu'un seuil inférieur ou égal à 0,6 fut sélectionné pour les protéines dont l'interaction à la CTNNB1 est diminuée par l'infection au VS. En appliquant ces critères, nous avons identifié 30 partenaires dont l'infection au VS module significativement le taux d'interaction, soit 10 protéines qui se dissocient et 20 protéines qui s'associent à la CTNNB1 (**Figure III.2**).

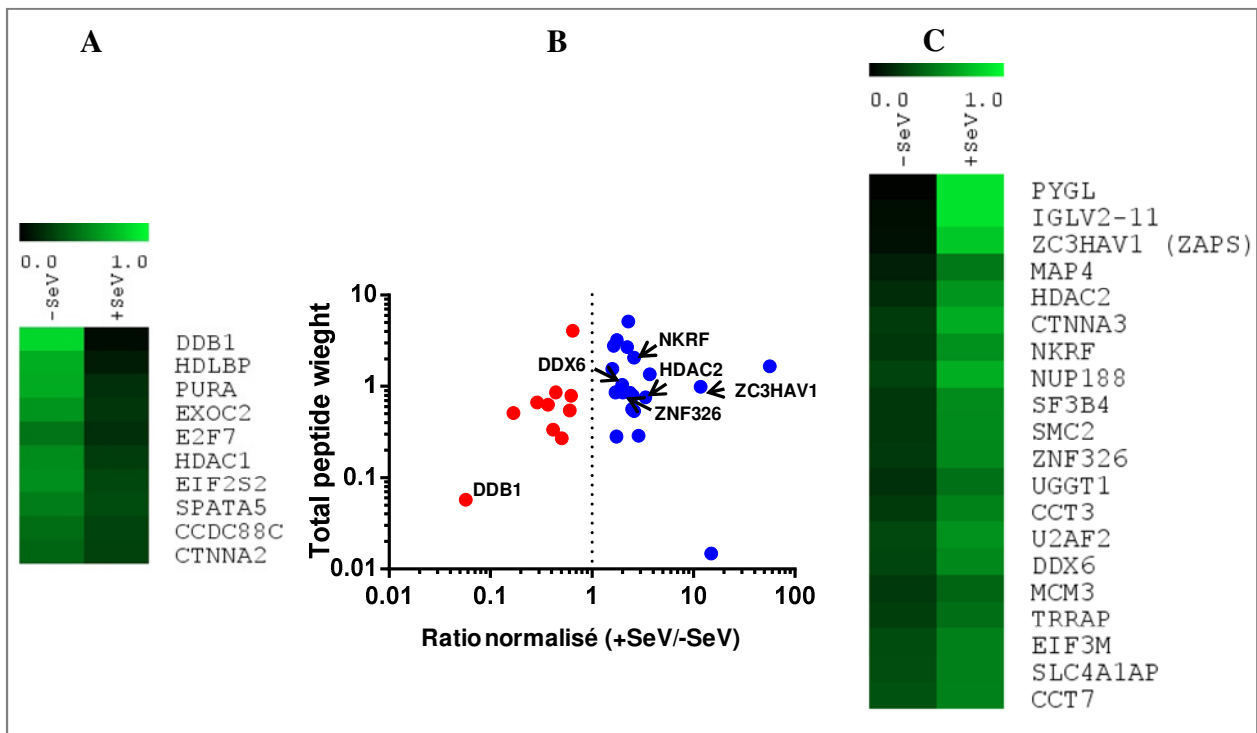


Figure III.2: Les partenaires dont l'interaction avec la CTNNB1 est modulable par l'infection virale. (A) Carte thermique (heat map) visualisant les quantités relatives de 10 protéines dont l'interaction est réduite suite à l'infection au VS. Ces protéines sont sélectionnées comme interactants spécifiques de la CTNNB1 (la somme des ratios des deux conditions de contrôle (Flag-MCS, Flag-eYFP) ne dépasse pas 0.4, et le ratio entre les quantités détectées dans les conditions d'immunoprécipitation de Flag-CTNNB1 dans des cellules infectées et non infectées au VS est inférieur ou égale à 0,6. Les protéines sont classées de la plus grande à la plus faible proportion de réduction selon l'analyse LC-MS/MS. La couleur foncée correspond à l'absence de la protéine dans la condition tandis que le vert plus clair indique une grande présence de la protéine dans la condition (échelle log2). (B) Nuage de points (scatter plot) représentant les protéines dissociées du complexe Flag-CTNNB1 suite à l'infection au VS (ratio+SeV/SeV ≤ 0.6 ; points rouges) et les protéines dont l'interaction est enrichie (ratio+SeV/SeV ≥ 1.5 ; points bleus). (C) Carte thermique (heat map) visualisant les quantités relatives de 20 protéines dont l'interaction est enrichie suite à l'infection par SeV (ratio+SeV/SeV ≥ 1.5).

Des 30 interactants identifiés, 5 protéines sont des partenaires connus de la CTNNB1 (CTNNA3, CTNNA2, HDAC1, HDAC2 et DDB1) et 2 protéines, CCT3 et TRRAP, s'y lient par l'intermédiaire de HDAC1 et HDAC2. (**Figure III.3**)

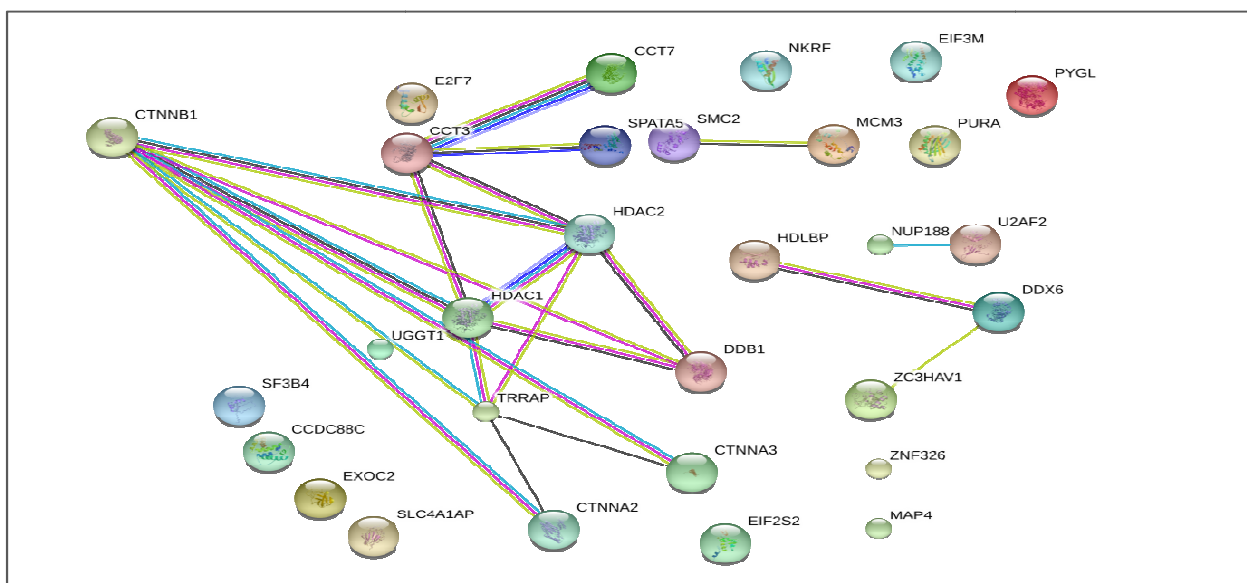


Figure III.3 : Réseau d'interaction protéine-protéine identifié à partir de STRING.

III.3.2 Analyse fonctionnelle des nouveaux partenaires de la CTNNB1

L'identification de nouveaux partenaires de la CTNNB1 nous a incités à la caractérisation de l'effet du silençage de leur expression sur la production d'IFNB1 lors d'infection virale. Pour réaliser cette étude, nous avons mis au point un criblage aux ARNis basé sur la transduction lentivirale de shARNs, en utilisant la librairie «MISSION TRC (The RNAi Consortium)» de Sigma. Pour cela, 4 à 5 clones de shARNs indépendants ciblant différentes portions de l'ARNm cible ont été produits pour un total de 21 interactants de la CTNNB1. Les HEK293T exprimant d'une façon stable le promoteur d'IFNB1 ont été transduites avec les lentivirus à

une MOI de 10 pour 4 jours afin d'assurer le silençage spécifique du gène, et par la suite infectées avec le VS pour 20h. Un criblage additionnel a été réalisé sur une population de cellules HEK293T exprimant un gène rapporteur sous le promoteur du facteur d'élongation EF1 (293T pEF1-fLuc) afin d'exclure les partenaires agissant de façon générale sur la machinerie de transcription (**Figure III.4, Annexe I.2**).

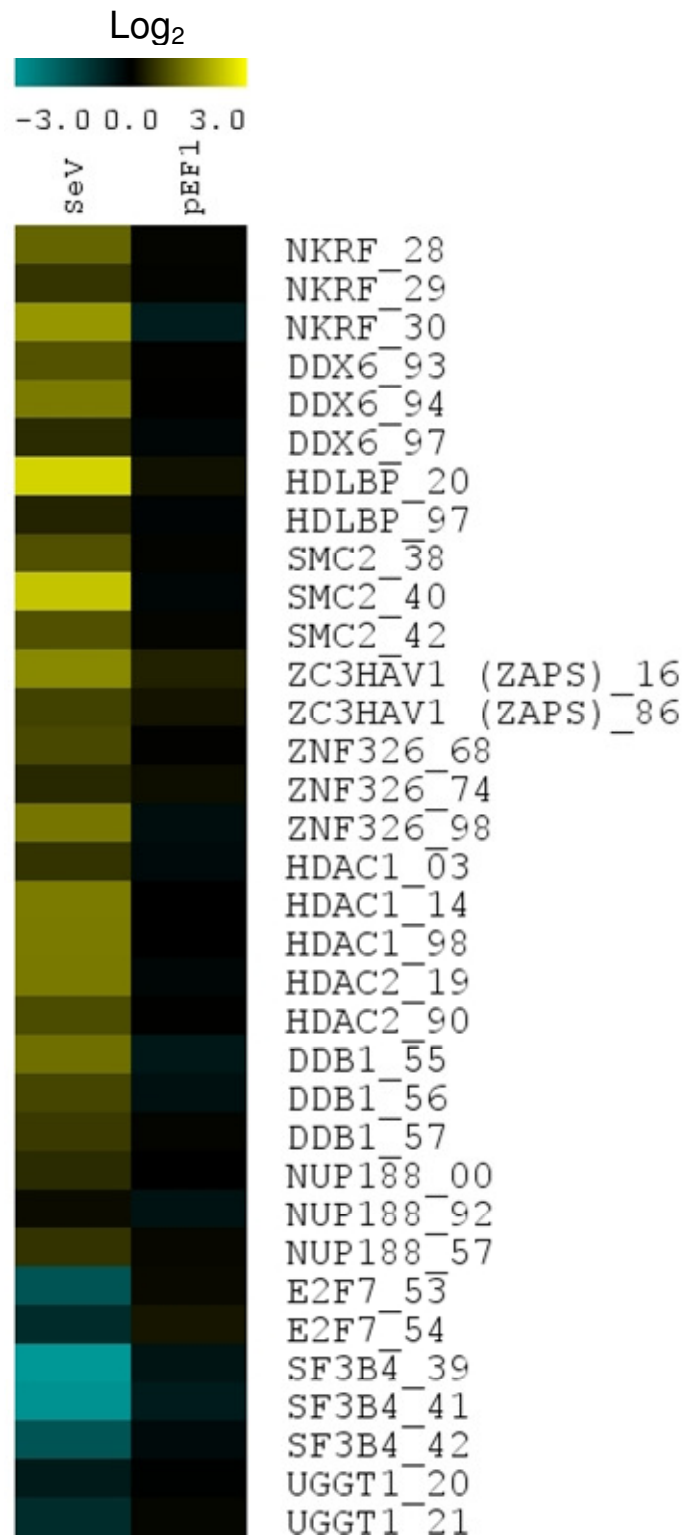


Figure III.4 : Résultats du criblage fonctionnel sur l'IFNB1-Fluc. Carte thermique (heat map) indiquant en échelle log₂ l'effet fonctionnel du silençage de 13 interactants de la CTNNB1 avec au moins deux lentivirus exprimant des shARNs indépendants sur le promoteur IFNB1-Fluc suite à l'infection par le VS (gauche) et sur le promoteur pEF1-Fluc (droite).

L'analyse fonctionnelle a permis l'identification de 13 gènes qui modulent spécifiquement l'expression de l'IFNB1 sans affecter le promoteur EF1 α . Le constat le plus important est que parmi les 13 gènes, 10 sont définis comme des régulateurs négatifs de l'IFNB1, car leur silençage augmente significativement l'activité du rapporteur IFNB1 induite par l'infection, et de façon similaire au rôle de la CTNNB1 décrit dans notre premier article.

Étant donné que la CTNNB1 est la protéine effectrice de la voie WNT canonique nous avons également procédé à l'exploration du silençage d'expression des interactants de la CTNNB1 modulables par le VS, sur son association avec les facteurs de transcription TCF/LEF et la modulation des gènes cibles. Pour ce faire, deux essais de criblage ont été réalisés parallèlement au criblage VS utilisant un gène rapporteur TOP-FLASH ayant des sites consensus pour la liaison du TCF/LEF. Dans un premier essai, la voie est stimulée par la protéine WNT3A et dans un deuxième essai avec l'inhibiteur de GSK3 'BIO'. Les deux traitements parviennent à stabiliser la CTNNB1 mais différemment; WNT3A mobilise la voie WNT depuis les étapes précoces à savoir la liaison avec son récepteur qui engendre la déstabilisation du complexe de destruction et la stabilisation de la CTNNB1. L'inhibiteur de GSK3 quant à lui, désactive l'activité catalytique de GSK3 menant à l'inhibition de la dégradation de la CTNNB1 et ainsi à son hyperactivation. Et donc la différence entre les deux traitements résulte de leur niveau de stimulation le long de la cascade de signalisation. Ainsi, l'essai avec la stimulation WNT3A permettra d'identifier les gènes dont la déplétion par shARN a un effet fonctionnel se situant en amont ou au niveau du CD tandis que le BIO identifiera les gènes dont la fonction est plus tardive c.à.d. en aval du CD.

L'addition des ces essais de criblage a permis de faire une étude fonctionnelle épistatique de la voie canonique WNT. Il en résulte l'identification de trois groupes fonctionnels :

-Un 1^{er} groupe de régulateurs dont l'effet fonctionnel affecte principalement l'activité transcriptionnelle de l'IFNB1 sans effet notable sur l'activation du rapporteur TOP-Flash par WNT3A et BIO. Parmi ces interactants de la CTNNB1, on trouve NKRF, ZAPS, DDX6 et SMC2 qui régulent négativement la production d'IFNB1. Seul le facteur transcriptionnel atypique E2F7, dont l'interaction à la CTNNB1 est réduite par l'infection, contribue à la production d'IFNB1 en agissant comme un régulateur positif (**Figure III.5**).

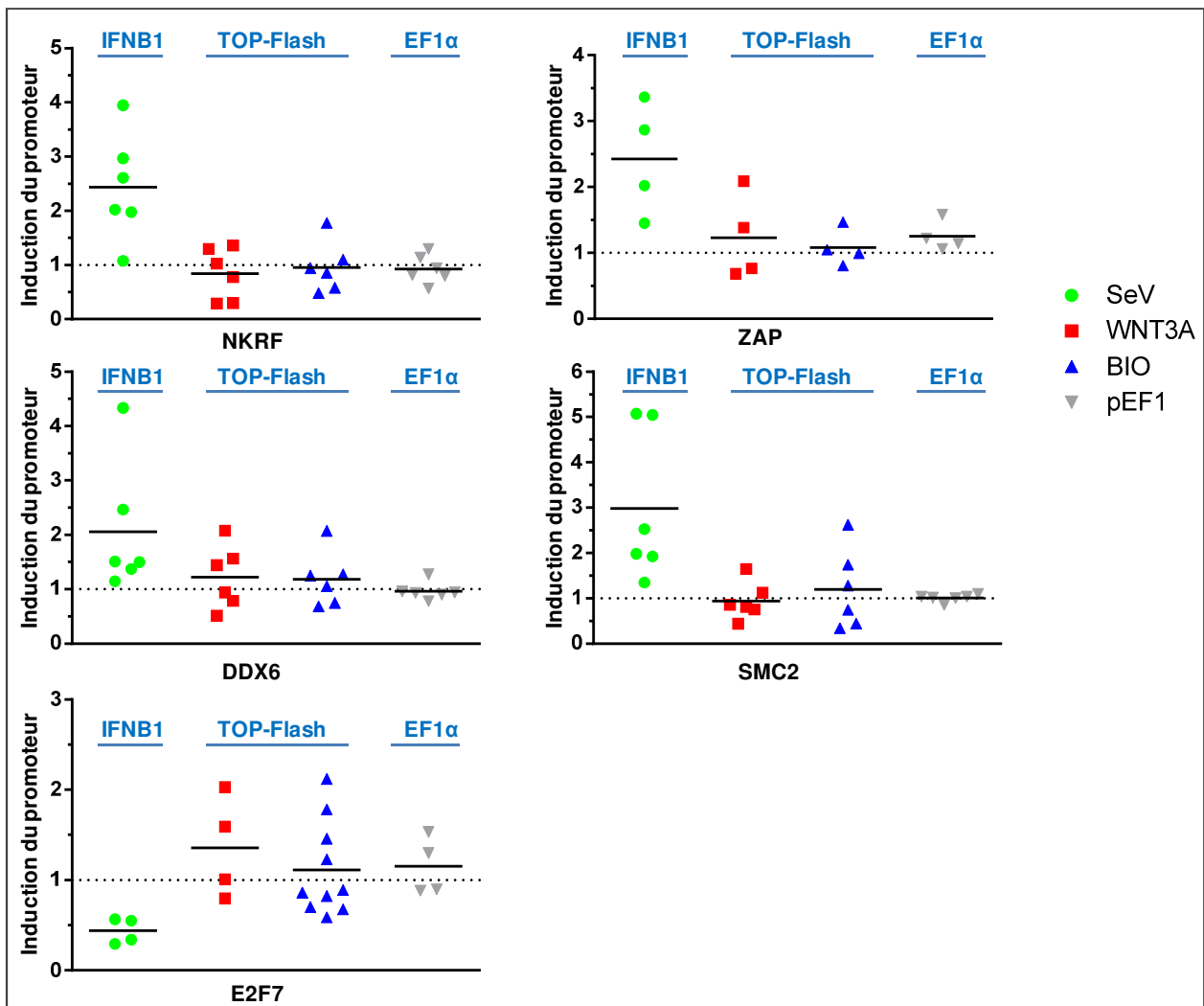


Figure III.5 : Groupe d'interactants de la CTNNB1 régulant spécifiquement l'expression d'IFNB1. Représentation schématique des niveaux d'induction des promoteurs IFNB1, TOP-Flash et EF1 α dans des cellules HEK293T, dont l'expression des partenaires NKRF, ZAP, DDX6 et SMC2 est réduite par silencage. Les cellules sont infectées avec le VS permettant l'induction du promoteur IFNB1, et traitées avec WNT3A ou BIO pour l'induction du promoteur TOP-Flash. Les résultats de deux criblages indépendants sont combinés pour chaque transduction par un shARN, et sont présentés en niveau d'induction relatif à celui en présence du shARN NT contrôlé normalisé à 1.

-Un 2^{ème} groupe de régulateurs négatifs dont le silencage affecte significativement le promoteur IFNB1 et le promoteur TOP-Flash. Pour ce dernier le même effet est observé, soit avec les deux stimulations WNT3A et BIO, ou légèrement accentué dans une des stimulations par rapport à l'autre. Ce groupe comprend les cinq gènes suivants : NUP188, HDLBP (High Density Lipoprotein-Binding Protein), HDAC1, HDAC2 et DDB1(DNA Damage-Binding Protein 1) (**Figure III.6**).

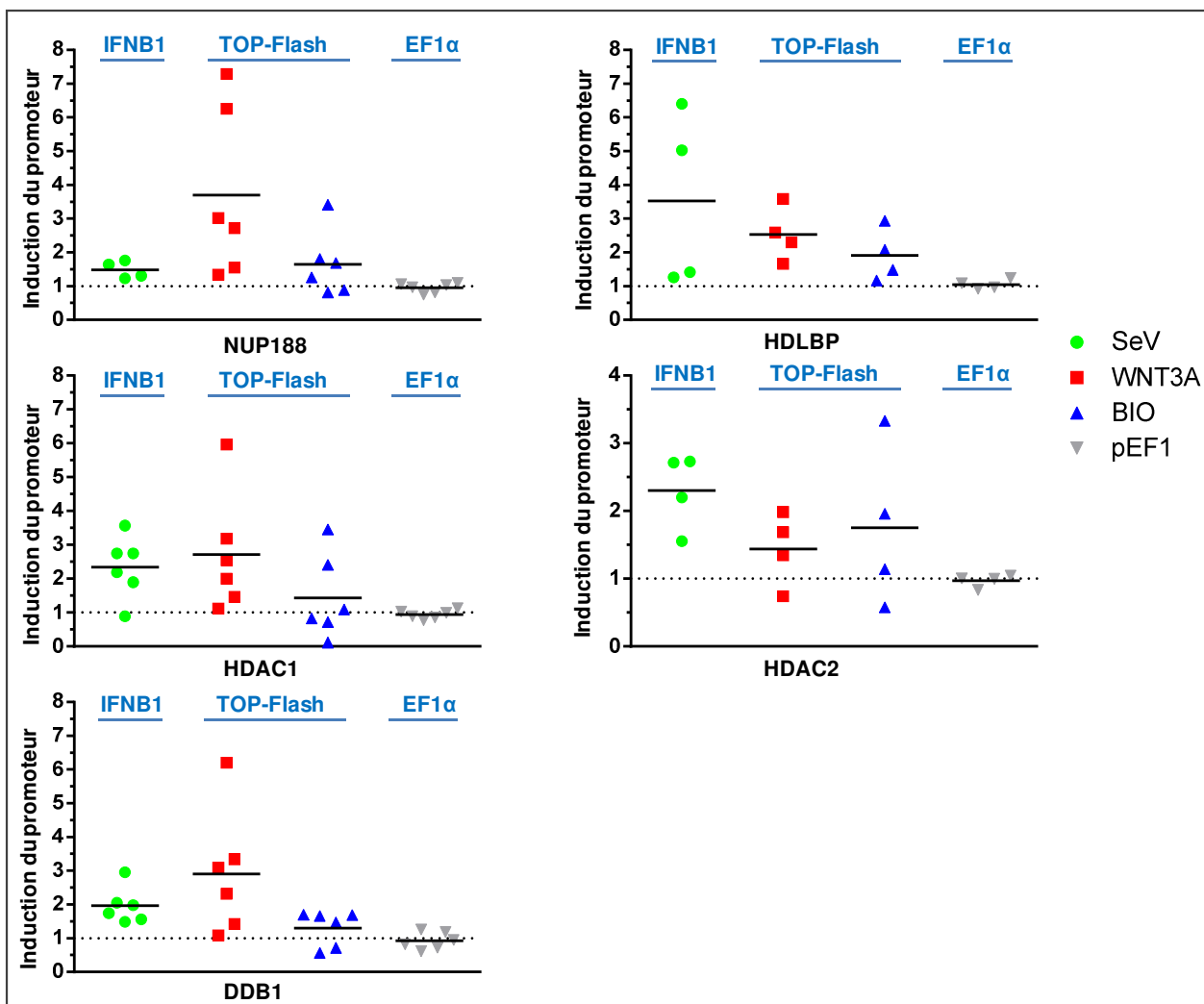


Figure III.6: Groupe d'interactants de la CTNNB1 régulant de la même façon l'expression d'IFNB1 et du TCF-LEF. Représentation schématique des niveaux d'induction des promoteurs IFNB1, TOP-Flash et EF1α dans des cellules HEK293T dont l'expression des partenaires NUP188, HDLBP, HDAC1, HDAC2 et DDB1 est réduite par silencage, et traitées avec VS pour l'induction de IFNB1, et WNT3A ou BIO pour l'activation du promoteur TOP-Flash.

Pour NUP188 on voit que l'effet est majeur sur le rapporteur dépendant de TCF-LEF surtout suite à une stimulation par WNT3A. Le même effet s'observe aussi avec les autres stimulations VS et BIO qui stabilisent la CTNNB1 mais avec une intensité modérée. Ces résultats indiquent que, soit la nucléoporine NUP188 restreint la translocation nucléaire de la

CTNNB1 stabilisée, soit permet la translocation nucléaire d'un régulateur négatif de l'activité transcriptionnelle de la CTNNB1. Le silençage de HDLBP, HDAC1 et HDAC2 affecte aussi les deux promoteurs mais de façon plus accentuée suite à la stimulation par le VS pour HDLBP et HDAC2, et suite à la stimulation WNT3A pour HDAC1. DDB1 profile un effet fonctionnel particulièrement intéressant car son silençage augmente significativement l'activité de l'IFNB1 et du TCF-LEF. De plus, l'effet sur le promoteur TOP-Flash est limité à la stimulation par WNT3A suggérant que DDB1 est un régulateur négatif précoce de la CTNNB1 et dont le rôle se situe en amont ou au niveau du CD.

-Le 3^{ème} groupe renferme les 3 gènes SF3B1 (Splicing Factor 3B subunit 1), UGGT1 (UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1) et ZNF326 (zinc finger protein 326) (**Figure III.7**). Leur caractéristique commune réside dans le fait qu'ils sont tous des partenaires dont l'interaction est augmentée par le VS et qui régulent d'une façon différentielle les deux promoteurs IFNB1 et TOP-Flash.

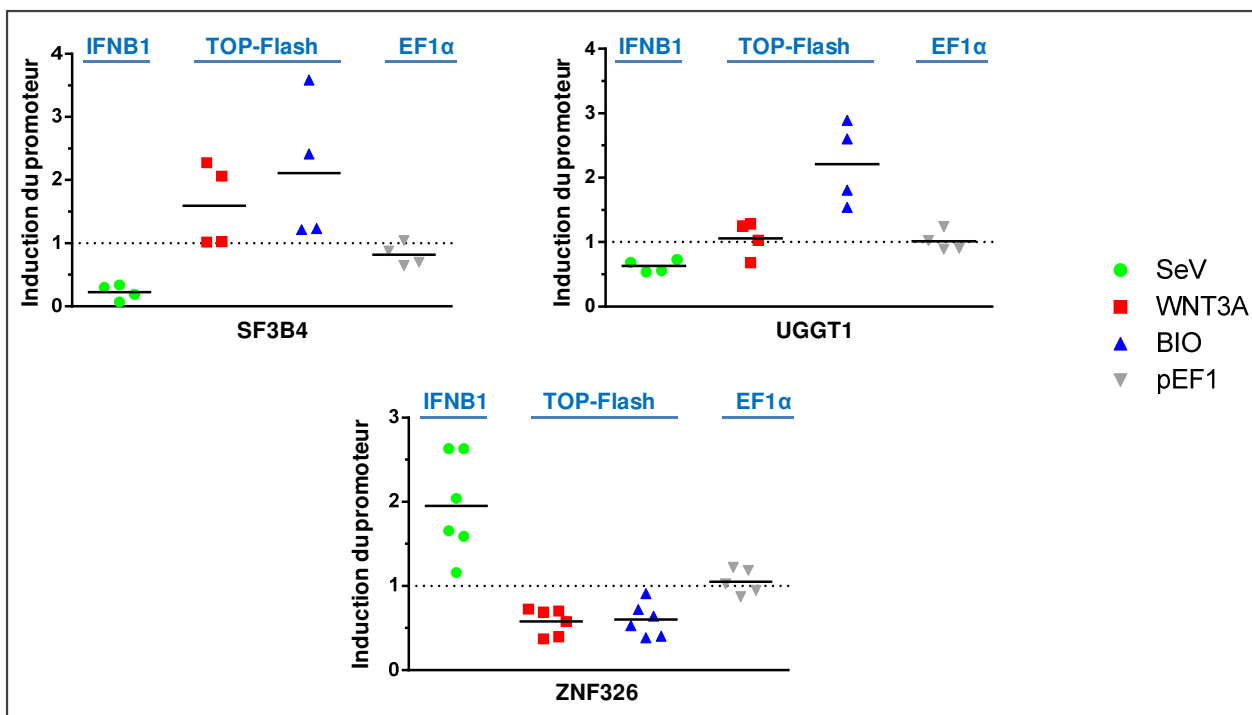


Figure III.7 : Groupe d'interactants de la CTNNB1 régulant d'une façon différentielle l'expression d'IFNB1 et du TCF-LEF. Niveaux d'induction des promoteurs IFNB1, TOP-Flash et EF1α dans des cellules HEK293T transduites par des lentivirus ciblant SF3B4, UGGT1 et ZNF326 et traitées avec SeV pour IFNB1 et WNT3A ou BIO pour le TOP-Flash.

SF3B4 et UGGT1 régulent positivement le promoteur IFNB1 tandis qu'ils régulent négativement l'activité transcriptionnelle de TCF-LEF. De plus, l'effet sur le TOP-Flash s'observe principalement suite au traitement par BIO pour UGGT1, suggérant que son effet fonctionnel sur l'activité transcriptionnelle de la CTNNB1 est tardif. Quant à ZNF326, il fonctionne en tant que régulateur négatif sur le promoteur IFNB1 et positif sur le TOP-Flash avec les deux stimulations. Ce groupe de gènes suggère que l'activité de la CTNNB1 peut être sujette à différentes régulations qui décident de son sort transcriptionnel dépendamment des stimulations reçues.

III.3.3 Validation de l'interaction et de l'effet fonctionnel du candidat sélectionné NKRF

Nous avons procédé par la suite à la sélection de candidats intéressants dans le but de

caractériser la signification de leur interaction avec la CTNNB1 dans le contexte d'infection virale. Nous avons choisi en premier lieu l'interactant NKRF induit par l'infection au VS, et en second lieu DDB1 dont l'interaction à la CTNNB1 est réduite par l'infection au VS, et qui sera abordé en détail dans le chapitre 4 (article 2).

Le gène NKRF code pour une protéine qui interagit avec la séquence de régulation négative (NRE) qui se trouve sur l'enhancéosome du gène IFNB1 [135]. De plus, cette régulation s'étend sur d'autres promoteurs ayant la séquence consensus 5'-AATTCCTCTGA-3', et dont la transcription est régulée par le facteur de transcription NF- κ B comme l'IL-8. NKRF a été impliqué dans l'inhibition de l'activité basale du promoteur de l'IFNB1 et de hiNOS (human inducible nitric-oxide synthase) [515].

Ces données font de NKRF un candidat à caractériser car il fonctionne comme un répresseur transcriptionnel ayant la capacité à lier directement l'ADN, une propriété dont CTNNB1 est dépourvue. Ces données préliminaires nous ont permis d'émettre l'hypothèse que les deux protéines font partie d'un complexe de co-répression sur le promoteur de l'IFNB1 suite à une infection virale afin de limiter les conséquences d'une réponse immunitaire prolongée.

III.3.3.1 Validation de l'interaction NKRF et CTNNB1

Tout d'abord, nous avons validé l'interaction lors de la surexpression de la CTNNB1 afin de reproduire les conditions de la spectrométrie de masse. Ainsi, nous avons détecté une interaction constitutive de la CTNNB1 avec NKRF (**Figure III.8A**). Nous avons également validé l'interaction endogène entre les deux protéines suite à l'immunoprécipitation de NKRF dans les conditions de base (**Figure III.8B**).

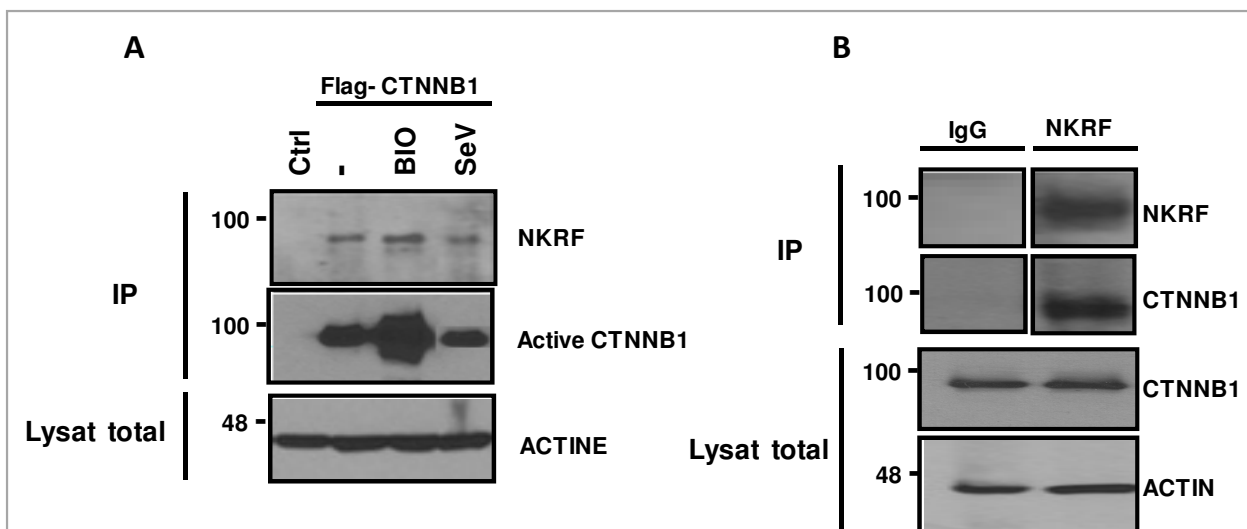


Figure 8 : Modulation de l'interaction NKRF et CTNNB1. (A) Co-immunoprécipitation de Flag-CTNNB1 avec NKRF endogène. Les cellules 293T ont été transfectées avec Flag-eYFP (contrôle) ou Flag-CTNNB1 pour 48h. Le lysat cellulaire total a été préparé après 20h de stimulation par BIO (5μM) ou le VS et soumis à l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-FLAG. Les extraits cellulaires (lysat total) et les complexes immuns ont été analysés par Western blot. (B) Co-immunoprécipitation de NKRF endogène avec la CTNNB1 endogène. Les cellules 293T ont été lysées puis immunoprécipitées avec un anticorps anti-NKRF ou un IgG (contrôle).

III.3.3.2 Validation de l'effet fonctionnel de NKRF

Notre étude fonctionnelle réalisée sur les interactants identifiés de la CTNNB1 a caractérisé NKRF comme un régulateur négatif affectant uniquement le promoteur d'IFNB1 suite à une stimulation avec le VS. Afin de valider ce résultat, nous avons produit les 5 lentivirus ciblant différentes régions de l'ARNm de NKRF. Nous avons observé que trois lentivirus génèrent le même phénotype en augmentant jusqu'à quatre fois l'activité luciférase du rapporteur IFNB1, et se comportant de façon similaire au silençage de la CTNNB1 (**Figure III.9**).

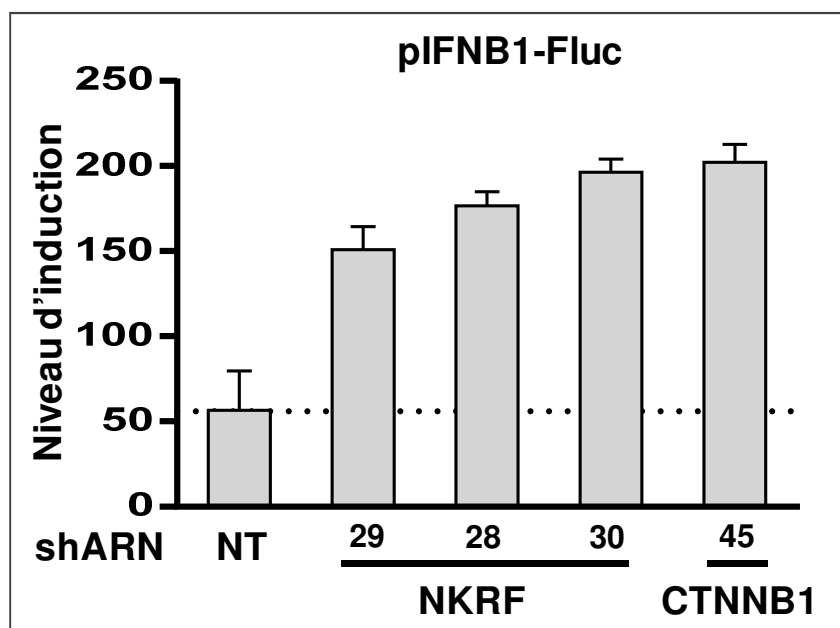


Figure III.9: NKRF est un régulateur négatif de l'immunité antivirale. Les cellules HEK293T exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur IFNB1 ont été transduites avec des lentivirus exprimant le shARN NT (contrôle), 3 shARNs ciblant NKRF ou shARN contre CTNNB1 pour 4 jours avant d'être infectées par le VS pour 20h.

Par ailleurs, une expérience clé dans notre premier article montre que l'inhibiteur de GSK3 (BIO) abolit d'une façon drastique la transcription d'IFNB1 et d'IFIT1 suite à l'infection virale. Pourtant, cet effet est partiellement ou complètement restauré après le silençage de la CTNNB1, indiquant ainsi que l'effet du BIO sur l'immunité innée résulte de son effet sur la stabilisation de la CTNNB1 qui pour sa part régule négativement la transcription des gènes anti-viraux (Chapitre II, Figure II.5A, 5D). En partant de l'hypothèse que la CTNNB1 et NKRF coopèrent ensemble afin de réguler négativement la réponse antivirale, nous avons reproduit la même expérience mais avec le silençage de NKRF et en traitant les cellules avec le VS et l'IFN α (Figure III.10).

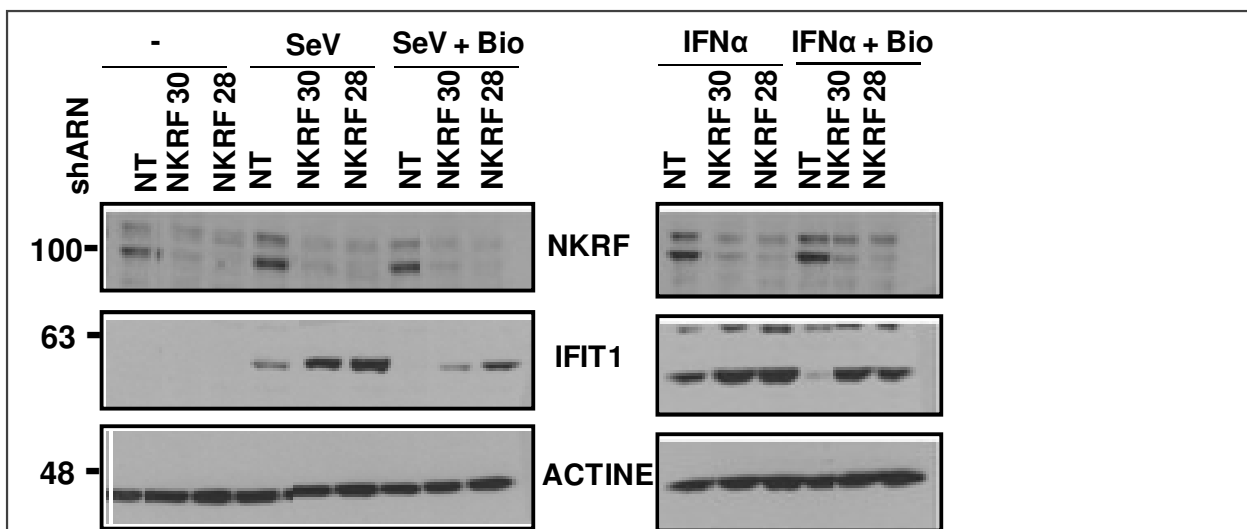


Figure III.10 : Régulation négative de l'immunité anti-virale par l'inhibition pharmacologique de GSK3 est restaurée par le silençage de NKRF. Les cellules HEK293T ont été transduites avec des lentivirus exprimant le shARN NT (contrôle) ou 2 shARNs ciblant NKRF pour 4 jours avant d'être infectées par le VS ou traitées avec IFNα en absence et présence de l'inhibiteur de GSK3 BIO (5μM) pour 20h.

On remarque d'abord que le silençage efficace de NKRF se traduit par l'augmentation des niveaux protéiques d'IFIT1 en réponse à l'infection par le VS et au traitement par IFNα supportant son rôle de régulateur négatif. D'autre part, l'effet du BIO est partiellement ou complètement restauré par le silençage de NKRF suite à l'infection par le VS et le traitement par l'IFNα, respectivement, démontrant un phénotype similaire au silençage de la CTNNB1. Ce résultat indique que la régulation de NKRF s'exerce aussi bien sur la cascade primaire de signalisation lorsqu'on active avec le VS que sur la cascade d'amplification de l'IFNα qui mène à la production des ISGs.

Sur la même ligne d'évidence, nous avons confirmé que le silençage de NKRF augmente plus que trois fois l'induction de la transcription endogène des ARNm pour l'IFNB1, IFIT1 et de TNFα par RT-qPCR suite à une infection au VS, similairement au silençage de la CTNNB1.

Plus intéressant encore, le silençage combiné des gènes NKRF et CTNNB1 ne profile pas un effet additif sur l'augmentation des ARNm des gènes testés, suggérant que la répression transcriptionnelle par ces 2 protéines fonctionne par un même mécanisme (**Figure III.11**).

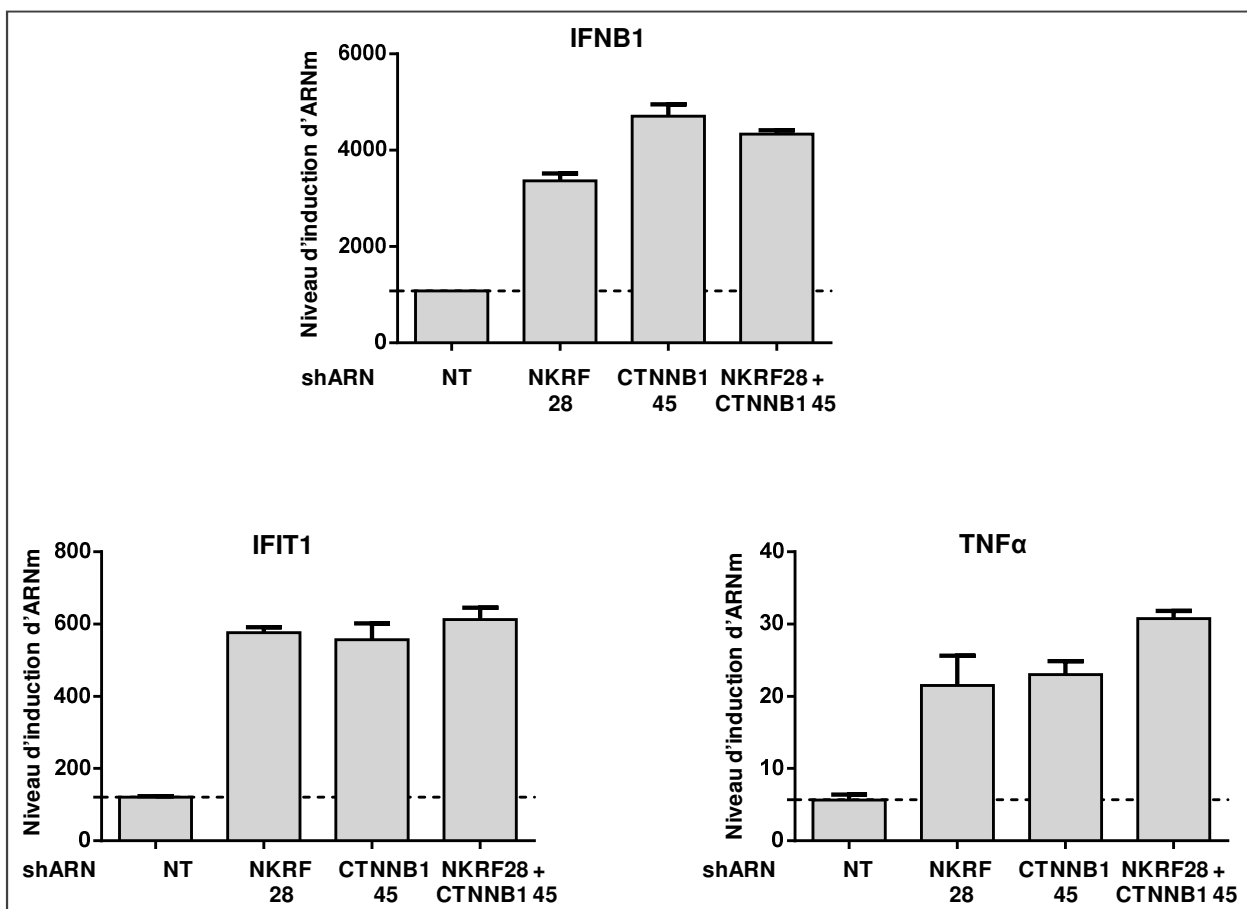


Figure III.11: NKRF régule négativement l'expression endogène de gènes anti-viraux. Niveau d'induction de l'ARNm d'IFNB1, IFIT1 et TNFα dans des cellules 293T transduites avec des lentivirus exprimant les shARNs contre NT (contrôle), NKRF, CTNNB1 ou NKRF+CTNNB1.

III.4 Discussion

Nous avons utilisé la technique de spectrométrie de masse pour identifier l'interactome de la CTNNB1 suite à l'infection par le VS, et avons focalisé notre intérêt sur les associations modulables en réponse à l'infection. Afin de donner plus de signification biologique à notre

étude, nous avons atténué l'expression des nouveaux partenaires de la CTNNB1 par un criblage aux shARNs dans des cellules exprimant d'une façon stable la luciférase sous le contrôle du promoteur de l'IFNB1. La plupart des partenaires modulables par le VS (24 sur 30) représente de nouvelles interactions qui se doivent d'être soumises à des études de validation. De plus, l'effet fonctionnel du silençage de la majorité des interactants parmi les 24 a sélectivement modulé l'expression d'IFNB1 et TOP-flash en réponse aux stimulations VS, WNT3A et BIO. L'analyse fonctionnelle a ainsi permis l'identification de groupes de partenaires qui affectent seulement l'expression d'IFNB1 (groupe 1), d'IFNB1 et du rapporteur TCF-LEF (TOP-Flash) de façon similaire (en les augmentant) (groupe 2) ou de façon différentielle (groupe 3).

III.4.1 La CTNNB1 interagit avec des partenaires appartenant à trois groupes fonctionnels dans sa régulation de l'immunité antivirale :

L'identification de partenaires de la CTNNB1 ayant un effet fonctionnel uniquement sur la régulation de l'expression d'IFNB1 indique que l'infection virale induit la formation d'un nouveau réseau protéique autour de la CTNNB1. Curieusement, la majorité des partenaires identifiés régulent négativement l'expression d'IFNB1. Plus important, plusieurs hits de ce groupe ont des fonctions rapportées importantes pour la régulation de l'immunité anti-virale, notamment NKRF qui est un répresseur transcriptionnel d'IFNB1[135], ZAP qui peut être phosphorylé par GSK3 β et régule l'activité de RIG-I [516] [517] [518] et finalement DDX6 qui régule négativement l'expression des ISGs suite à l'infection par des virus à ARN [519]. Toutes ces données s'alignent avec notre découverte de la modulation de la voie de signalisation des RLRs par la CTNNB1 suite à la stimulation virale. D'autre part, le fait d'avoir identifié des partenaires qui régulent aussi bien l'expression d'IFNB1 et du TCF-LEF

indiquent qu'il y a une régulation croisée entre les deux voies de signalisation durant l'infection virale. Ces hits doivent représenter des associations physiques importantes pour les fonctions de la CTNNB1. Ils peuvent présenter des noeux importants de connexion entre les deux voies de signalisation qui pourraient-par exemple- être ciblés par les virus oncogéniques. Ainsi, ces virus peuvent induire la voie WNT et avoir au même temps un impact sur la réponse innée au profit de leur réplication et en ciblant un seul régulateur.

La stabilisation contexte spécifique de la CTNNB1 est un mécanisme décrit par plusieurs rapports impliquant des E3 ligases différentes [344-350]. Dans notre cas, DDB1 étant une composante des E3 ligases CUL4, sera un bon hit à valider aussi bien pour son rôle dans la signalisation canonique que durant l'infection virale. Nous discuterons plus en détail ce hit dans le chapitre IV de la thèse. Nous avons également identifié deux HDACs particulièrement intéressantes dans le contexte de la signalisation WNT/CTNNB1 et d'IFNB1. Les HDACs sont des histones déacétylases qui peuvent être recrutées sur plusieurs complexes transcriptionnels multiprotéiques et servir de co-répresseurs épigénétiques qui inhibent la transcription des gènes cibles [520]. HDAC1 et HDAC2 sont bien décrites comme des compétiteurs avec la CTNNB1 pour l'interaction avec les facteurs TCF/LEF [274]. En effet, en absence de signal WNT, HDAC1/2 en association avec d'autres co-répresseurs comme Groucho mène à l'inhibition de la transcription liée aux facteurs TCF/LEF. La stimulation WNT ramène la CTNNB1 qui permet l'activation de la transcription via l'expulsion de ces corépresseurs associés aux HDACs [274]. Ainsi, notre criblage fonctionnel a confirmé le rôle de HDAC1/2 comme des régulateurs négatifs de la voie TCF-LEF en réponse à WNT3A et BIO. D'autre part, les HDACs de classe I (notamment HDAC1, 2, 3 et 8) semblent être les HDACs prédominants régulant négativement l'immunité innée déclenchée par les TLRs.

HDAC1 peut inhiber l'activité induite par le TLR de nombreux promoteurs de gènes inflammatoires, notamment IL12p40, COX2 et IFNB1 dans les cellules dendritiques et des macrophages[521]. Et plus récemment, il a été rapporté que le represseur de tumeur Rb recrute HDAC1 et HDAC8 afin de réprimer la transcription d'IFNB1 suite à l'infection virale en déacétylant le promoteur au niveau des macrophages [140]. Il sera très pertinent de vérifier si l'inhibition de l'expression IFNB1 résulte de la répression épigénétique exercée par un complexe CTNNB1-HDAC1/2. L'observation que HDAC2 s'associe avec la CTNNB1 tandis que HDAC1 s'y dissocie suite à l'infection par le VS nécessite plus d'investigation. Il se peut que la cinétique d'infection et de la réponse immunitaire soit un facteur discriminatoire de la HDAC à impliquer. Il se peut aussi que HDAC1 se dissocie de la CTNNB1 pour continuer à bloquer la transcription TCF-LEF qui se garde complètement inactive suite à l'infection par le VS malgré la stabilisation de la CTNNB1.

Le groupe d'interactants régulant l'expression d'IFNB1 et de TCF-LEF d'une façon opposée suggère que la CTNNB1 peut interagir avec des facteurs qui activent ou répriment deux événements cellulaires différents. Une possibilité serait que ces partenaires soient recrutés sur la CTNNB1, lors d'une infection virale pour empêcher l'activation du TCF-LEF tout en permettant de réguler négativement l'expression d'IFNB1. Dans ce groupe, ZNF326 requiert un intérêt particulier car il affiche une régulation négative du rapporteur IFNB1 et positif du TOP-Flash. ZNF326 et DBC1 font partie du complexe DBIRD qui régule l'élongation des transcripts en fonctionnant dans l'interface entre les ARNm naissants et l'ARN-polymérase II (POLII) [522]. Curieusement, une étude très récente a prouvé que ZNF326 interagit avec la CTNNB1 et régule positivement la transcription TCF-dépendante suite à la stimulation WNT [523]. Plus intéressant, l'étude a décrit que ZNF326 peut aussi réguler la phosphorylation (au

niveau de la Ser45) et l'acétylation (au niveau de la lys49) de la CTNNB1 indirectement en augmentant l'expression de HDAC7 [523]. Ces données supposent que l'interaction ZNF326-CTNNB1 régulerait plusieurs processus physiologiques impliquant la CTNNB1.

Il se peut que ZNF326 fasse partie du complexe de répression incluant la CTNNB1 pour perturber l'élongation du transcript d'IFNB1 suite à l'infection virale. Ce constat, bien que préliminaire, nous incite à considérer d'autres scénarios dans notre analyse de l'effet répressif de la CTNNB1. Il se peut que le complexe répressif soit positionné sur le promoteur d'IFNB1 afin d'inhiber le recrutement de la machinerie de pré-initiation de la transcription comme il peut interférer avec la machinerie de l'élongation afin de terminer prématurément la transcription.

III.4.2 Le potentiel rôle du complexe CTNNB1-NKRF dans la régulation négative de la réponse antivirale

NKRF est un gène candidat faisant partie du groupe d'interactants de la CTNNB1 qui régulent spécifiquement l'expression d'IFNB1 (groupe 1). Nous avons validé une interaction endogène entre NKRF et la CTNNB1. Sur le plan fonctionnel, le silençage de NKRF augmente significativement la transcription d'IFNB1, d'IFIT1 et de TNF α d'une façon similaire au silençage de la CTNNB1 suite à l'infection par le VS. De plus, le silençage combiné de la CTNNB1 et de NKRF n'affiche pas un effet additif sur l'augmentation transcriptionnelle de ces gènes anti-viraux, suggérant que ces deux protéines fonctionnent par un même mécanisme. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que la CTNNB1 et NKRF font partie d'un même complexe protéique qui régule négativement la transcription d'IFNB1, d'IFIT1 et de TNF α .

NKRF est initialement décrit comme un répresseur transcriptionnel interagissant avec les séquences de régulation négative (NRE) de certains gènes cibles des facteurs NF- κ B, comme IFNB1 [135], IL-8 [524], et hiNOS [515] afin de réprimer leur transcription au niveau basal. Toutefois, nos résultats démontrent clairement que NKRF réprime l'expression des gènes IFNB1, TNF α et IFIT1 après l'induction virale. Ces résultats soulignent que les fonctions de NKRF ne se limitent pas à la répression de l'activité basale des gènes. Ces données sont consistantes avec le rôle de NKRF dans la répression d'IL-8 et d'IP-10 suite à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) [525] et par l'observation que la surexpression de NKRF réprime aussi bien l'activité basale que cytokine-induite du hiNOS [524].

Il est intéressant de noter que trois modes d'emploi différents sont proposés pour NKRF dans la régulation des promoteurs. Le premier dépend de la séquence NRE qui se trouve sur le promoteur proximal et s'entrecoupe avec l'élément de liaison de NF- κ B. C'est le cas par exemple du promoteur d'IFNB1 et d'IL-8 [135, 524]. Dans ces cas NKRF interfère directement avec l'activité transcriptionnelle de NF- κ B. D'ailleurs, une interaction directe entre NKRF et la sous-unité p65 de NF- κ B est validée comme étant à l'origine de la répression d'IP-10 et IL-8 dans des monocytes infectées par MTb [525, 526].

Un deuxième mode implique une séquence NRE distale par rapport au promoteur et ne s'entrecoupant pas avec un site de liaison de NF- κ B. Ce mécanisme est décrit dans le cas de la transcription du hiNOS où le site NRE se trouve 6,7kb en amont du promoteur et à une distance d'au moins 1kb des sites de liaison NF- κ B [524]. Conformément à ça, il a été montré précédemment que l'effet inhibiteur de NRE sur les éléments NF- κ B peut se faire à des

distances allant jusqu'à 2,5kb [151]. Toutefois, les mécanismes moléculaires de cette régulation ne sont pas encore éclaircis.

Un troisième mode d'emploi qui n'implique pas la capacité de NKRF à lier l'ADN et donc ne dépend pas de la séquence NRE. Ce mode est décrit dans la régulation de gènes cibles dépendants de NF- κ B comme MMP2, COX2, MYC et miR301a [527].

Nos résultats démontrent que NKRF régule négativement la transcription d'IFNB1, cette régulation devrait s'inscrire dans le 1^{er} mode d'emploi décrit de NKRF vu que le promoteur d'IFNB1 contient la séquence NRE et dépend de NF- κ B.

Toutefois, le promoteur TNF α n'a pas de séquence NRE mais son induction transcriptionnelle requiert la liaison des facteurs de transcription NF- κ B. Et donc soit il y a un élément NRE distal comme décrit dans le deuxième mode ou la régulation de ce gène par NKRF est NRE indépendante comme décrit dans le mode 3.

Curieusement, NKRF régule aussi l'expression d'IFIT1 dont le promoteur n'a pas de séquence NRE et ne dépend pas de NF- κ B. De plus, cette action de NKRF semble être directe sur la signalisation des IFNs de type I, vu que le silençage de NKRF augmente considérablement les niveaux protéiques d'IFIT1 suite au traitement par l'IFN α (**Figure 10**). Ces données suggèrent que la régulation de ce gène est NRE indépendante, il reste à savoir si NF- κ B régule la transcription d'IFIT1.

En effet, il n'est pas connu si les facteurs NF- κ B régulent directement l'expression du promoteur d'IFIT1, mais il a été montré que des sites de liaison des facteurs NF- κ B se trouvent sur les promoteurs de plusieurs ISGs et régulent leur expression suite à l'induction

par les IFNs de type I [528, 529]. Plus intéressant encore, les facteurs NF- κ B régulent négativement l'expression d'un groupe d'ISGs en réponse aux IFNs de type I. Ainsi, la voie NF- κ B activée par les IFNs de type I contrebalance l'activité des IFNs à induire la réponse anti-virale [530, 531]. Ces dernières années, plusieurs données ont prouvé qu'outre la voie JAK-STAT, d'autres voies de signalisation telles que MAPK et PI3K/Akt, jouent un rôle essentiel dans la réponse IFN de type I en modulant l'expression des ISGs aux niveaux transcriptionnel ou traductionnel [532]. Ce concept est documenté par exemple dans le cas de la protéine IQGAP2, qui se trouve impliquée dans la régulation de l'induction de plusieurs ISG par l'IFN de type I d'une manière dépendante de son interaction avec p65 et indépendante de la voie JAK-STAT [533]. Ce type de régulateurs est défini comme étant des gènes effecteurs d'IFN (IEGs en anglais pour Interferon Effector Genes), car contrairement aux ISGs, ces gènes ne sont pas induits par les IFNs mais ils régulent l'induction IFN-dépendante des ISGs. Et donc, il sera possible que NKRF fasse partie de ces IEGs qui régulent l'induction NF- κ B dépendante de certains ISGs. Toutefois, outre les trois modes d'emploi proposés, il sera possible que NKRF exerce des fonctions variées qui ne dépendent pas forcément de sa capacité à lier l'ADN ou de son interaction avec NF- κ B.

L'ajout le plus important de notre étude est la découverte d'un nouvel élément de régulation exercée par NKRF qui le lie directement avec la CTNNB1. Les liens fonctionnels établis entre NKRF et NF- κ B ainsi qu'entre la CTNNB1 et NF- κ B appuient fortement nos travaux, qui ont identifié une nouvelle interaction importante entre NKRF et la CTNNB1 dans des cellules infectées. Ce qui suggère que l'effet répressif du complexe CTNNB1-NKRF sera médié par NF- κ B, du moins, sur les promoteurs dont l'expression dépend de NF- κ B comme l'IFNB1 et TNF α . Ainsi, il sera pertinent de valider dans un premier temps l'existence d'un complexe

NKRF-CTNNB1 et la relation avec la présence de NF- κ B p65, dans différentes infections virales par des techniques de co-immunoprécipitation et de colocalisation par microscopie confocale à fluorescence. Les techniques de fractionnement cellulaires seront très utiles pour confirmer la localisation cellulaire de ce complexe avant et après stimulation virale dans des cellules épithéliales et immunes.

D'autre part, nous avons réussi à détecter l'interaction endogène entre NKRF et la CTNNB1 d'une façon reproductible, il nous reste à mapper cette interaction pour savoir les domaines structuraux nécessaires à cette régulation. À cet égard, nous avons produit plusieurs mutants de NKRF et de la CTNNB1. Il nous reste également à valider la modulation de l'interaction CTNNB1-NKRF suite à l'infection virale pour confirmer son enrichissement suite à l'infection virale. Afin de mieux comprendre la dynamique de cette interaction, il sera judicieux d'évaluer l'interaction endogène entre les deux protéines suite à une cinétique d'infection. De plus, nous avons initié des essais d'immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) afin d'évaluer la dynamique de recrutement ou déplétion de la CTNNB1 et NKRF sur le promoteur d'IFNB1 suite à une cinétique d'infection par le VS.

En partant de l'hypothèse que les deux protéines coopèrent ensemble dans un complexe de répression transcriptionnel, on pourra vérifier si la déplétion de l'une affecte le recrutement de l'autre. Simultanément, afin de corréler les résultats du ChIP avec le phénotype de régulation négative, il faut vérifier par ChIP/qPCR si la déplétion de CTNNB1 et NKRF affecte le recrutement des facteurs de transcription IRF3, p65 et C-JUN requis lors de la transcription d'IFNB1. Les essais d'EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) permettront d'évaluer

l'existence d'un complexe CTNNB1-NKRF avant et après stimulation virale sur le promoteur, et de vérifier si la séquence NRE est requise pour la formation de ce complexe.

En conclusion, la CTNNB1 a des actions cruciales dans plusieurs processus biologiques. La connaissance approfondie de sa biologie rendra son ciblage thérapeutique plus accessible. L'aspect qui requiert plus d'intérêt actuellement est l'identification de régulateurs clés qui la connectent avec différentes voies de signalisation selon le contexte biologique. L'utilisation de l'approche protéomique et génomique nous a permis d'identifier des candidats très spécifiques à l'action de la CTNNB1 dans le contexte viral, augmentant ainsi les niveaux de connaissance dans ce domaine et ouvrant la voie à plusieurs avenues thérapeutiques.

Chapitre IV

IV. DDB1 differently regulates CTNNB1 protein levels upon WNT3A activation and Sendai virus infection.

Salwa Es-Saad, Martin Baril and Daniel Lamarre.

Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada. Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada.

IV.1 Abstract

WNT signaling is a fundamental pathway in regulation of proliferation and differentiation of cells. The key effector protein of the pathway is β -catenin (CTNNB1), which is constantly phosphorylated by glycogen synthase kinase-3 beta isozyme (GSK3 β) leading to its proteasomal degradation. Upon activation, CTNNB1 is stabilized to modulate the transcription of target genes. We recently showed that CTNNB1 is also stabilized upon Sendai virus (SeV) infection and negatively regulates antiviral response. Here, we combined an affinity purification of ectopically expressed FLAG-tagged CTNNB1 with quantitative mass-spectrometry to identify interactors that are modulated by GSK3 inhibition. We identified DNA damage-binding protein 1 (DDB1) as an interactor of CTNNB1 that is reduced of the protein destruction complex upon WNT3A activation. We showed that DDB1 negatively regulates CTNNB1 transcriptional activity upstream of the destruction complex by promoting its ubiquitination and reducing protein half-life following WNT3A stimulation. Strikingly, CTNNB1 ubiquitination is inhibited in SeV-infected cells and restored upon DDB1 depletion, consistent with a distinct role of DDB1 in preventing CTNNB1 degradation and inhibiting the antiviral innate response. This work identifies DDB1 as a regulator of CTNNB1 protein levels

following WNT3A activation that differently operated in virus-infected cells to reduce the innate immune response.

IV.2 Introduction

CTNNB1 is a dual function protein that plays a critical role as a transcriptional co-regulator of growth-promoting genes and as an adaptor protein regulating the coordination of cell-cell adhesion at tight junctions. WNT signaling is the major regulator of CTNNB1 protein levels. In the absence of WNT stimulation, CTNNB1 is efficiently captured by the destruction complex composed of AXIN, APC (adenomatous polyposis coli protein), GSK3B (glycogen synthase kinase 3 β), CSNK1A1 (casein kinase I isoform alpha, also known as CK1 α) and PP2A [534]. CSNK1A1 phosphorylates CTNNB1 at Ser45, which primes phosphorylation by GSK3B at Thr41, Ser37 and Ser33 residues [284]. Phosphorylated CTNNB1 is then targeted for ubiquitin-dependent degradation by the E3 ligase FBXW1A (F-box/WD repeat-containing protein 1A, also known as β -TrcP), resulting in a low concentration of free CTNNB1 protein in the cytoplasm despite constitutive transcription of the gene [359]. WNT signaling is triggered by the binding of WNT ligands to Frizzled (FZD) receptors and low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5/6 co-receptors, subsequently leading to GSK3B- or CSNK1A1-mediated phosphorylation of the intracellular region of LRP6 and recruitment of AXIN and dishevelled (DVL) proteins to the FZD receptors at the plasma membrane. The activated receptor complex results in the dissociation of CTNNB1 from the destruction complex allowing its cytoplasmic stabilization and nuclear translocation. In the nucleus, active CTNNB1 interacts with TCF/LEF transcription factors to activate the transcription of WNT target genes [535].

The high frequency of WNT pathway mutations in many different cancers underscores the importance of WNT/CTNNB1 signaling to carcinogenesis. Both missense mutations and other mutations that are predicted to disrupt the phosphorylation and degradation of CTNNB1 represent the most common aberrations in many cancers, including colorectal carcinoma, hepatocellular carcinoma, medulloblastoma and ovarian cancer [536]. Most WNT pathway mutations that are observed in cancer result in hyperactivation of CTNNB1-related signaling. Thus, ubiquitination and proteasomal degradation of CTNNB1 by a set of E3 ubiquitin ligases represent the cornerstone of WNT pathway regulation. Subsequently, new E3 ubiquitin ligases that target CTNNB1 for degradation in a WNT dependent pathway have been identified, including Jade-1 [346] and c-Cbl [348]. As CTNNB1 can be also activated besides WNT dependent pathways, other WNT-independent mechanisms regulating its stability have also been described. For example, P53-induced E3 ubiquitin-protein ligase SIAH1 can ubiquitinate non-phosphorylated CTNNB1 leading to its degradation during genotoxic stress [345, 378], and TRIM33 can target WNT and EGF-induced CTNNB1 for degradation in the nucleus [349]. The redundancy in polyubiquitination-dependent degradation of CTNNB1 illustrates the requirement for a tight control of its protein levels. Although our knowledge on the multiple signaling pathways involved in CTNNB1 regulation has greatly expanded in recent years, our understanding of partners regulating its different functions remains poorly understood. Identifying novel CTNNB1 partners will undoubtedly provide mechanistic insights into CTNNB1 related human diseases and will afford new therapeutic targets.

Proteomic approaches have previously been successful in identifying new components of the CTNNB1 signaling pathway. One striking example is the identification of the cancer associated protein WTX as a required component of the CTNNB1 destruction complex [537].

Interestingly, WTX was described as a negative regulator of CTNNB1 by promoting its ubiquitination and degradation. This discovery has provided mechanistic explanation for the tumor suppressor activity of WTX which is mutated in 30% of pediatric Wilms tumor. The WNT pathway is thus viewed as a strong candidate for therapeutic intervention in many cancer diseases. We recently reported a novel role of a canonical WNT/CTNNB1 pathway in innate immunity and showed that CTNNB1 negatively regulates antiviral response of various RNA viruses (SeV, HCV, FLU) (14), supporting the existence of virus-specific CTNNB1 interaction subnetwork. Here, we performed a quantitative IP-MS/MS approach in HEK 293T cells overexpressing a FLAG-tag CTNNB1 and identified 39 interacting proteins that are selectively modulated, either depleted or enriched, by the stabilized form of CTNNB1 following the pharmacological inhibition of GSK3 with the BIO inhibitor compound. These selective interactors were subjected to a functional RNAi silencing study following activation of the pathway with WNT3A or GSK3 inhibitor and quantification through the TCF/LEF-promoter driven reporter activity (TOP-flash). We identified 14 CTNNB1 interaction partners (5 positive or 9 negative) that specifically regulate TCF/LEF transcription, and positioned them within the WNT signaling pathway according to their inhibition profile in the epistatic RNAi study. We further investigated a role of these partners in regulating interferon-beta (IFNB1) production of SeV-infected cells. We identified DNA damage-binding protein 1 (DDB1), a component of numerous distinct DDB1-CUL4-X-box E3 ubiquitin-protein ligase complexes, as a CTNNB1 interactor that negatively regulates the WNT signaling pathway upstream of the destruction complex. We showed that DDB1 is distinctly involved in the regulation of CTNNB1 protein levels by promoting its ubiquitination and degradation in

WNT3A-activated cells while stabilizing CTNNB1 in SeV-infected cells to negatively regulate IFNB1 induction.

IV.3 Materials and Methods

Cell culture

Human HEK 293T (embryonic kidney), mouse L Wnt-3A (fibroblast CRL-2647; ATCC), A549 (human lung adenocarcinoma epithelial), HeLa (human epithelial carcinoma), SW480 and HCT116 cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamine (all from Wisent) at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. Cell population of HEK 293T stably harboring pEF1α-LUC used in the screen and cells stably harboring pIFNB1-LUC was produced after selection with 200 µg/ml of hygromycin B (Wisent) as previously described [461]. Human WNT3A containing supernatant was produced by plating 5,000,000 L Wnt-3A cells in a 100 mm plate and harvesting the supernatant after 5 days in culture and filtration on a 0.45 µm filter. Transfections were performed with linear 25 kDa polyethylenimine (PEI) (Polysciences, Inc) at 3 µg PEI to 1 µg DNA ratio.

Lentiviral shRNA library production

From the MISSION TRC lentiviral library (Sigma-Aldrich), 27 MS hits were selected and shRNA were produced as follows. Five different shRNA-expressing lentiviruses per gene were produced individually in HEK 293T cells (2×10^4) that are plated one day prior to transfection. Transfections were performed using a Biomek FX (Beckman Coulter) enclosed in a class II cabinet according to MISSION® Lentiviral Packaging Mix protocol (SHP001). Viruses were collected at 24 and 48 hours post transfection and were pooled prior to freezing. A non target sequence (NT) shRNA-expressing control lentivirus and 4% of random samples

of each plate were used to measure lentiviral titers for quality control purposes. Titers were determined by limiting dilution assays using HeLa cells. Briefly, samples were diluted in complete DMEM (1:400 or 1:10,000) and added to HeLa cells. Media was changed at day 3 and 5 with complete DMEM containing 1 µg/ml puromycin (Wisent). After four days of selections, cells were stained with 1.25% crystal violet and plaque-forming units were counted to determine viral titer.

Firefly luminescence assay

For screening, cells were seeded in white 96-well plates at a density of 5,000 HEK 293T or 1,250 HEK 293T pEF1α-LUC in 100 µl of complete phenol-red free DMEM containing 4 µg/ml polybrene. Infection with lentivirus encoding shRNA were carried out immediately after cell seeding at a MOI of 10 and incubated for four days at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. HEK 293T cells were transfected with 100 ng of M50 Super 8xTOP-flash[488] (Addgene plasmid 12456) for 24 hours. Cells were treated by adding one volume of media containing human WNT3A or by adding GSK-3α/β inhibitor 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO; B1686 Sigma) to a final concentration of 2.5 µM sixteen hours before cell lysis and firefly luminescence reading in a 100 mM Tris acetate, 20 mM Mg acetate, 2 mM EGTA, 3.6 mM ATP, 1% Brij 58, 0.7% β-mercaptoethanol and 45 µg/ml luciferine pH 7.9 buffer. All infections were performed in an enclosed in a class II cabinet.

Plasmids and antibodies

pcDNA3-Flag-DDB1 and pcDNA3-myc3-CUL4A were purchased from Addgene. Phospho-deficient mutant of CTNNB1 S33A/S37A/T41A (referred here as CTNNB1 3A), β-TrCP and HA-ubiquitin expression plasmids were kindly provided by Dr.Marc Servant. Western Blot analysis was performed using anti-total CTNNB1 (BD transduction laboratories and

Epitomics), anti-CTNNB1 active (Millipore), anti-p- β -catenin Ser33/37/Thr41 (Cell Signaling), anti-DDB1 (Invitrogen), anti-IgG (Millipore), anti-HA (Santa Cruz), anti-ACTIN (Chemicon International), anti-MYC (Santa Cruz) and anti-GAPDH (Santa Cruz). MLN 4924 was purchased from EMD Millipore.

Immunoprecipitation for mass-spectrometry

For immunoprecipitation (IP), 25 μ g of pcDNA3.1_FLAG-MCS, pcDNA3.1_FLAG-eYFP or pcDNA3.1_FLAG-CTNNB1 expression plasmid [507] was transfected for two days in 15 cm plates seeded with 9,000,000 HEK 293T cells. Sixteen hours prior to harvesting, cells were treated with 5 μ M BIO or 0.5% DMSO (untreated condition). FLAG-protein expressing cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS; Wisent), harvested and lysed in 10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH7.6 with EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Cell lysates were clarified by centrifugation at 13,000 g for 20 min at 4 °C. Resulting cell extracts were adjusted to 1 mg/ml and 10 mg was subjected to IP as follows: preclearing of the lysates was done by incubating lysates with 40 μ l of 50:50 slurry of immunoglobulin G-Sepharose (GE Healthcare) prepared in the lysis buffer with IgG beads for one hour at 4 °C. Pre-cleared lysate were immunoprecipitated by adding 50 μ l of M2 anti-FLAG affinity gel (Sigma-Aldrich) prepared in TBS buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) for two hours at 4 °C. Immunoprecipitates were washed two times in lysis buffer and four times in TBS buffer. Immune complexes were eluted twice from the resin using 100 μ l NH₄OH 0.5M (pH 11.7) for 15 minutes at 4 °C and separated in two tubes: 25 μ l for gel electrophoresis and silver staining, and 175 μ l for MS-MS analysis before being dried using a SpeedVac.

Mass spectrometry

Affinity-purified protein complexes were resuspended in 50 μ l of 50 mM ammonium bicarbonate. TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) was added to the protein samples at the final concentration of 5mM. Samples were incubated at 37°C at 650 rpm for 30 min. 30 μ l of chloroacetamide at 55 mM was added and the samples were incubated at 37°C at 650 rpm for 30 min. Tryptic digestion (1 μ g each, Promega) was performed overnight at 37°C and samples were dried down in a SpeedVac and resolubilized in 50 μ l of aqueous 5% ACN (FA, 0.2%). Samples (20 μ l each) were injected on a C18 precolumn (0.3 mm i.d. x 5 mm) and peptides were separated on a C18 analytical column (150 μ m i.d. x 100 mm) using an Eksigent nanoLC-2D system. A 56-min gradient from 10–60% ACN (0.2% FA) was used to elute peptides at a flow rate of 600 nL/min.

The LC system was coupled to a LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher). MS analyses were performed using data dependent acquisition where each full MS spectrum was followed by six collision induced dissociation (CID) MS/MS spectra in the linear ion trap for the most abundant multiply charged ions. The conventional MS spectra (survey scan) were acquired in the Orbitrap at a resolution of 60,000 for m/z 400 after the accumulation of 10^6 ions in the linear ion trap. Mass calibration used a lock mass from ambient air [protonated $(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O})_6$; m/z 445.120029], and provided mass accuracy within 15 ppm for precursor ion mass measurements. The dynamic exclusion of previously acquired precursor ions was enabled (repeat count 1, repeat duration: 15 s; exclusion duration 15 s). MS/MS spectra were acquired in CID mode using an isolation window of 2 Da and precursor ions were sequentially isolated and accumulated to a target value of 10,000 with a maximum injection time of 100 ms.

Protein identification and quantitative analysis

The centroided MS/MS data were merged into single peak-list file (Distiller, V2.4.2.0) and searched with the Mascot search engine 2.2. (Matrix Science) against a concatenated forward and reversed human IPI database (IPI human v3.54) containing 150,858 forward protein sequences. Mascot was searched with a parent ion tolerance of 10 ppm and a fragment ion mass tolerance of 0.5 Da and one miscleavage. Carbamidomethylation of cysteine, oxidation of methionine, deamidation, phosphorylation of serine, threonine and tyrosine residues were specified as variable modifications. The false discovery rate (FDR) was calculated as the percentage of positive hits in the decoy database *versus* the target database, and a FDR of 1% was considered for both proteins and peptides. Protein identification is reported only for those assigned with a minimum of 2 peptides per protein. The data were processed using the Mascot 2.2 (Matrix Science) search engine.

Label-free quantitative proteomics was used to profile protein abundance across sample sets, as reported previously [538, 539]. Briefly, Mascot peptide identifications were matched to ion intensity (MS peak intensity, minimum threshold: 10,000 counts) extracted from the aligned MS raw data files (tolerances set to m/z: 15 ppm and RT: 1 minute). For each LC-MS run, we normalized peptide ratios so that the median of their logarithms was zero, to account for unequal protein amounts across conditions and replicates. Intensities were summed across fractions for peptides of identical sequences, and protein ratios were calculated as the median of all peptide ratios, while minimizing the effect of outliers. Only proteins defined by two or more peptide quantification events and identified in at least two independent experiments were considered. For each identified proteins, relative fold quantification was determined by the ratio of one FLAG-protein IP over the total for the four IPs (FLAG-MCS, FLAG-eYFP, FLAG-CTNNB1 and FLAG-CTNNB1 + BIO). Proteins for which the total amount present in

the two controls represented more than 40% of the total were discarded as non-specific partners. Remaining proteins were classified as enriched (average ratio FLAG-CTNNB1 BIO/FLAG-CTNNB1 > 1.8) or depleted (average ratio FLAG-CTNNB1 BIO/FLAG-CTNNB1 < 0.5) in the BIO condition. In addition, enrichment or depletion needed to be observed in at least two out of the three independent experiments to be selected.

Human interactome

Protein-protein interactions were retrieved from <http://www.genemania.org> [540], <http://thebiogrid.org/> [541] and manual curation of the literature.

Lentiviral shRNA production

293T cells were transfected using PEI with 6 mg pLKO.1-puro encoding shRNA targeting DDB1 (TRCN000082853, TRCN000082855, TRCN000082856 and TRCN000082857), GSK3 β (TRCN0000010551, TRCN0000039565), LRP6 (TRCN0000033405, TRCN0000033406), CTNNB1 (TRCN0000003845) or shRNA nontarget (NT, Sigma), 1.5 mg pMDLg/pRRE, 1.5 mg pRSV-REV, and 3 mg pVSVg as previously described [513]. After 48 hours, medium containing lentiviral vector was harvested and cellular debris were removed by filtration (0.45 μ m). Titers were determined by limiting dilution assay using HeLa cells, as described above.

Western blot and CO-immunoprecipitation

Cells were washed and prepared as described above, proteins were resolved using dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE), then proteins were electro-transferred onto a nitrocellulose membrane. The membranes were probed with primary antibodies followed by HRP-conjugated secondary Ig raised against the appropriate species (Bio-Rad) and bands were detected using the Western Lightning ECL kit (Perkin-Elmer, Waltham, MA). Band density

was quantified using ImageJ 1.47v software (National Institutes of Health, USA), and the results were analyzed as relative intensity normalized to the non stimulated control). For Co-IP, Pre-cleared lysates were immunoprecipitated by adding 1ug of antibody and incubating at 4°C overnight. Immune complexes were captured with 50 µl of protein G-Sepharose suspension, washed for four times with Triton X-100 lysis buffer, and bound proteins were eluted with 100 µl of 1X loading buffer.

In vivo ubiquitination assays

HEK 293T cells were transduced with lentiviruses targeting NT or DDB1 two days prior transfection with HA-ubiquitin constructs alone or together with the indicated plasmids for overexpression assays. Forty-eight hours after transfection, cells were treated with 10µM of proteasome inhibitor MG132 (Sigma) for 4 hours and then harvested using 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.6 with EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Cells lysates were immunoprecipitated with monoclonal anti-CTNNB1 antibody (BD).

Digitonin extraction

Cells washed with ice-cold PBS were covered with buffer containing 120mM KCl, 5mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, pH 7.4, 2mM EGTA, 0.15 mg/ml digitonin (Sigma) and gently rocked on ice for 15 min. The gently aspirated supernatant was used as digitonin extract for Western blot analysis.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical significance for comparison of more than two groups was assessed with one-way

ANOVA. Statistical relevance was evaluated using the following p values: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**) or $p \leq 0.001$ (***).

IV.4 Results

IV.4.1 Identification of CTNNB1 interaction partners modulated by GSK3 inhibition

To study a specific protein interaction subnetwork of CTNNB1 following GSK3 inhibition, we used a strategy based on the identification of CTNNB1-containing protein complexes coupled to a combined IP-MS/MS. To this end, FLAG-CTNNB1 and FLAG-eYFP were ectopically expressed in HEK293T cells that are either untreated (DMSO) or treated for 16 hours with the GSK3 inhibitor BIO. This approach should mainly identify proteins that are enriched or depleted from the major CTNNB1 unphosphorylated stabilized form (active CTNNB1) mimicking what occurs in many cancers expressing aberrantly constitutive active CTNNB1. Cellular lysates were subjected to immunoprecipitation using a resin coupled to anti-FLAG antibodies and FLAG-CTNNB1 interactants were isolated with a high pH ammonium hydroxide elution buffer (**Figure IV.1A**).

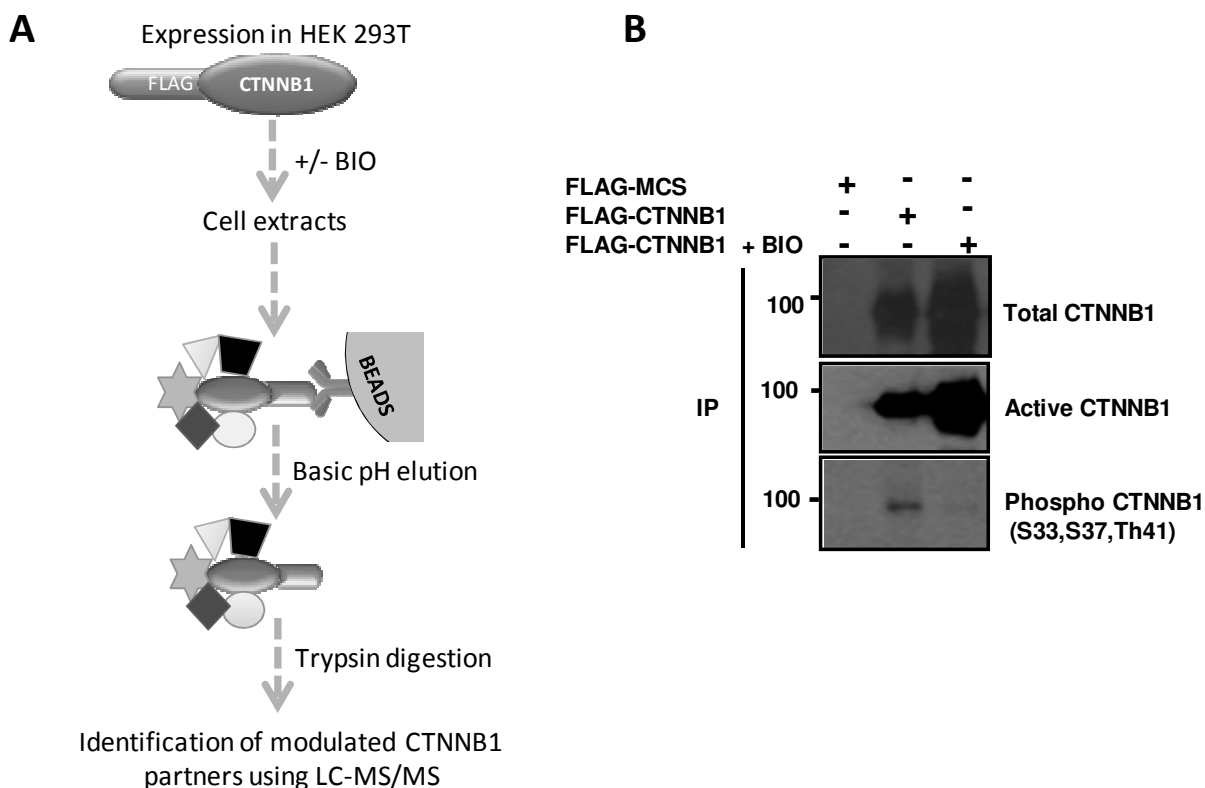


Figure IV.1: Identification of CTNNB1-protein interactions modulated by GSK3B inhibition. (A) Schematic representation of FLAG-tagged CTNNB1 immunoprecipitation. (B) 293T cells were transfected either with FLAG-MCS (control) or FLAG-tagged CTNNB1 plasmids for 48 hours. The whole-cell lysates were prepared 16 hours following treatment with GSK3 inhibitor BIO (5 μ M) before being subjected to immunoprecipitation directed against FLAG. Cell extracts and immune complexes were analyzed by Western blotting using anti-total CTNNB1, anti-Active CTNNB1 and anti Phospho-CTNNB1 (Ser33/37/Thr41) antibodies.

As expected, the FLAG-CTNNB1 protein was stabilized in BIO-treated cells as revealed by increased levels of the immunoprecipitated unphosphorylated form (active CTNNB1) following a decreased degradation of CTNNB1 by the destruction complex (**Figure IV.1B**). Immunoprecipitated proteins of cell extracts were digested with trypsin and subjected to LC-MS/MS. Label-free quantitative proteomics was used to profile protein abundances across sample replicates and conditions. From three independent experiments, data were clustered to

correlate the abundance of interacting proteins between immunoaffinity extracts. LC-MS/MS analyses from all isolated protein complexes enabled the identification of 5071 unique peptides from 1137 proteins with a false discovery rate less than 1%. Overall, 586 proteins were reproducibly detected in multiple immunoaffinity protein extracts with at least two peptides per protein (**Figure IV.2A, Annexe2**). By determining the proportion of individual interacting protein for each immunoprecipitated bait condition (Σ proportions = 1 for all baits), we calculated the fold enrichment. Only proteins whose sum of the two mock controls (FLAG-MCS, FLAG-eYFP) did not exceed a threshold of 0.4 were selected.

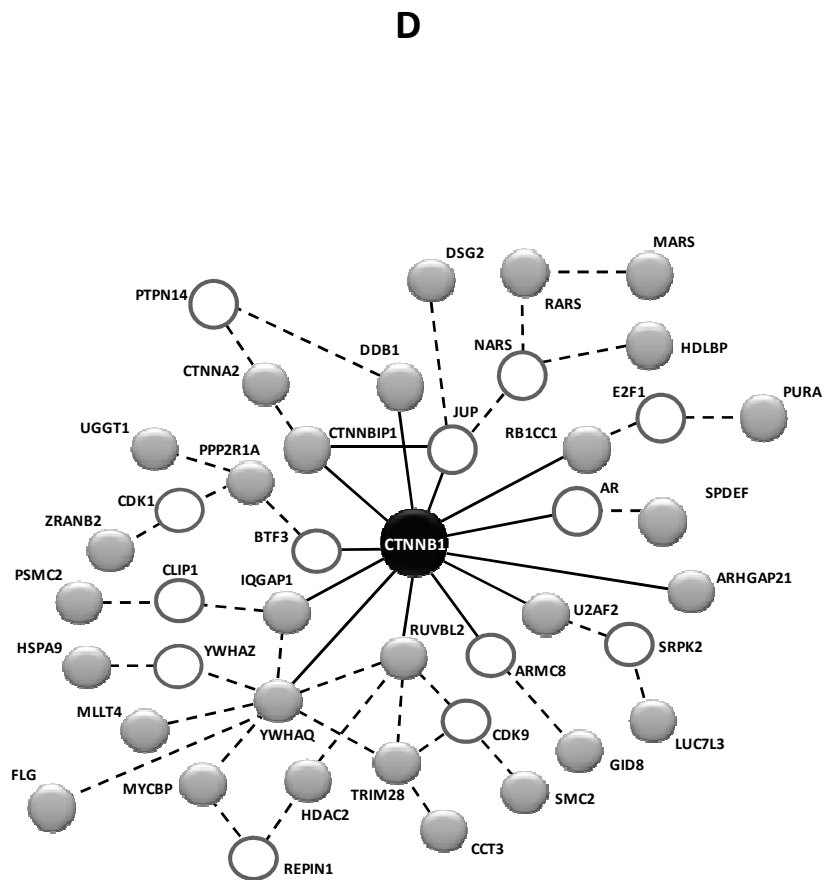
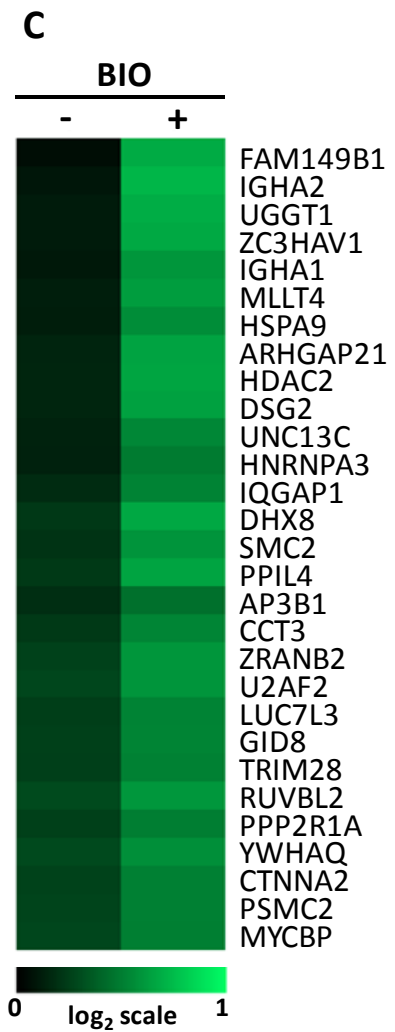
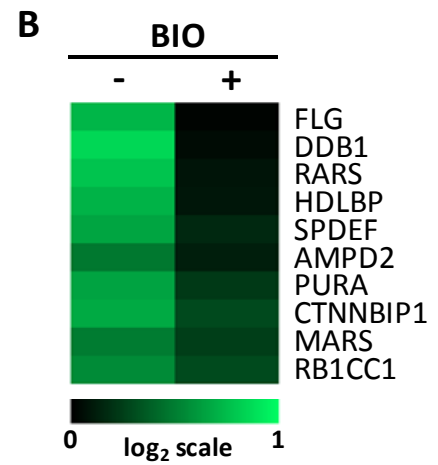
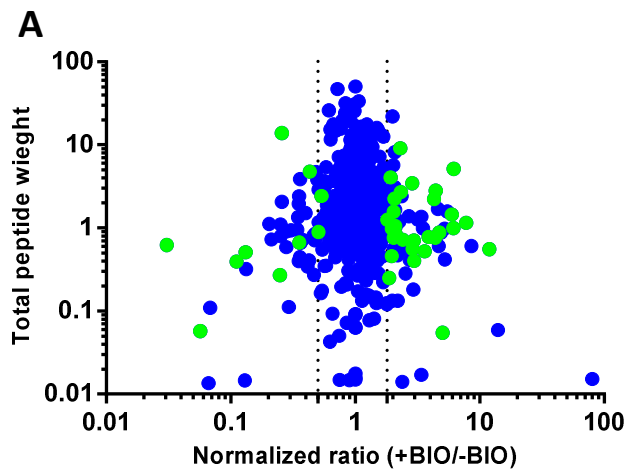


Figure IV.2: CTNNB1 interactome at steady state and following GSK3 inhibition. (A) Scatter plot of normalized +BIO/-BIO ratio of the 586 identified proteins and total peptide intensities. Proteins found to be depleted from the FLAG-CTNNB1 complex upon BIO treatment (ratio +BIO / -BIO < 0.55) and proteins found to be enriched in the FLAG-CTNNB1 complex upon BIO treatment (ratio +BIO / -BIO > 1.8) are colored in green. (B) Heat map visualization of the relative quantities for 10 proteins found to be depleted from the FLAG-CTNNB1 complex upon BIO treatment. Proportions of presence for each of the four experimental conditions are represented for each CTNNB1 interactor (Σ four conditions = 1 for each protein). The proteins are ordered from greatest to lowest depletion proportion as determined by LC-MS/MS. The darker color correlates with the absence of the protein in the condition and brighter green indicates a high prevalence of the protein in the condition (log₂ scale). (C) Heat map of the relative quantities for 29 proteins found to be enriched in the FLAG-CTNNB1 complex upon BIO treatment. (D) Protein-protein interaction network of were identified using GeneMANIA [1]. Grey circles represent proteins by LC-MS/MS and white circles are intermediate proteins not present in the LC-MS/MS analysis, but allowing connection of interactors to CTNNB1. Solid and dotted lines represent known and new interactions, respectively.

Our proteomic analysis confirmed the presence of core members of the destruction complex, including AXIN1, APC and GSK3B (**Figure IV.S1A**). In order to identify proteins that are modulated upon GSK3 inhibition, we calculated for each interactor the ratio between the amounts in the FLAG-CTNNB1 immunoprecipitation of BIO-treated cells and of untreated cells. A ratio of 1.8 was used as a cutoff of enrichment for proteins specifically bound to CTNNB1 and a ratio of 0.55 for proteins that are depleted as the consequence of BIO treatment (**Figure IV.S1B**). In addition, we selected proteins in which enrichment or depletion needed to be observed in at least two out of the three independent experiments. Using these criteria, 10 proteins were depleted of CTNNB1-associated complexes upon GSK3 inhibition by more than 10-fold for some interactors (DDB1, FLG) (**Figures IV.2B** and **IVS2B**), possibly due to reduced binding of the unphosphorylated active form or to a preferential binding with the phosphorylated form that is decreased in the immunoprecipitation. Three of these proteins were previously found to bind CTNNB1 directly (CTNNBIP1, DDB1 and RB1CC1) [542-544] and seven were described as new CTNNB1 interactors. Five of these new

interactors could be linked to CTNNB1 through interacting networks (HDLBP, MARS, RARS, PURA and SPDEF), while two proteins could not be connected to CTNNB1 (AMPD2 and FLG) (**Figure IV.S2A**). The proteomic analysis also identified 29 interactors that are enriched upon GSK3 inhibition due to increased binding of the CTNNB1 unphosphorylated stabilized form and increased CTNNB1 levels (**Figures IV.2C** and **IV.S1B**). Five of these proteins have been already shown to associate directly with CTNNB1 (ARHGAP21, IQGAP1, RUVBL2, U2AF2 and YWHAQ) [545-548], while 14 of the 24 novel interactors could be linked to CTNNB1 through interaction networks (**Figure IV.S2B**). To allow a wide-ranging view of the study, data from both depleted and enriched CTNNB1 interactors following GSK3 inhibition are integrated in a protein-protein interaction network (**Figure IV.2D**).

IV.4.2 Functional analysis of newly identified CTNNB1 interaction partners.

The activation of the WNT pathway promotes specific gene expression via interaction of CTNNB1 with T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) transcription factors. We then explored the functional significance of the identified interactors in the regulation of CTNNB1-dependent TCF/LEF-promoter driven reporter activity (TOP-Flash) by conducting an RNAi silencing screen (**Figure IV.S3A**). Five independent shRNA-expressing lentiviruses were produced per gene for a total of 27 CTNNB1 partners, including 21 newly identified interactors, and used in transducing HEK293T cells at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for four days to ensure efficient knockdown (KD) (**Annexe 1**). Twenty four hours before cell lysis and firefly luminescence reading, cells were transfected with M50 Super8xTOP-flash and treated with WNT3A-conditioned medium or with GSK3 inhibitor (BIO). Modulation patterns of the TOP-flash activity following activation of the pathway at different steps in KD cells

allow the classification of CTNNB1 interactors in the WNT signaling pathway (**Figure IV.S3B**). As a validation of our epistasis study, we tested the effect of knocking down control genes (LRP6, GSK3 and CTNNB1) in both conditions (**Figure IV.S3C** and **IV.S3D**). The silencing of LRP6 with two independent shRNAs produced an eightfold decrease in TOP-flash activity in WNT3A-treated cells (**Figure IV.S3C**), while no significant effect was observed upon downstream activation with BIO (**Figure IV.S3D**). The depletion of GSK3, which is a negative regulator of WNT/CTNNB1 pathway, increased the TOP-flash activity by approximately twofold following WNT3A stimulation (**Figure IV.S3C**), while no significant effect was observed following BIO treatment (**Figure IV.S3D**). Finally, CTNNB1 KD completely abrogated TOP-flash stimulation in both assays, as expected (**Figures IV.S3C** and **S3D**). To facilitate visualization of screen results and epistasis classification, we opted to combine results obtained with each shRNA and replicates for each gene hit, and to present results as relative TOP-flash fold induction where shRNA NT is normalized to 1 (**Figure IV.3A** is a graphical representation of combined data of **Figures IV.S3C** and **IV.S3D**). An additional screen was included to remove hits for which the KD affects the TOP-flash through a broad effect on transcription by monitoring luciferase activity produced from the constitutively active elongation factor 1 alpha promoter (*EF1 α* , also known as *EEF1A1*). Screening of the 132 shRNAs targeting expression of 27 CTNNB1 interactors resulted in the identification of 14 genes that specifically modulate CTNNB1-dependent TOP-flash activity without affecting luciferase expression from the *EF1 α* promoter. The inhibition profile of each shRNA in the epistatic study allowed classification of these 14 CTNNB1 interactors into three functional groups within the WNT3A canonical signaling pathway. The first group is represented by four positive regulators (PR) acting downstream the destruction complex as

their KD showed similar inhibition of TOP-flash activity with both WNT3A and BIO stimulations (TRIM28, AP3B1, ZC3HAV1 and RUVBL2) (**Figure IV.3B**).

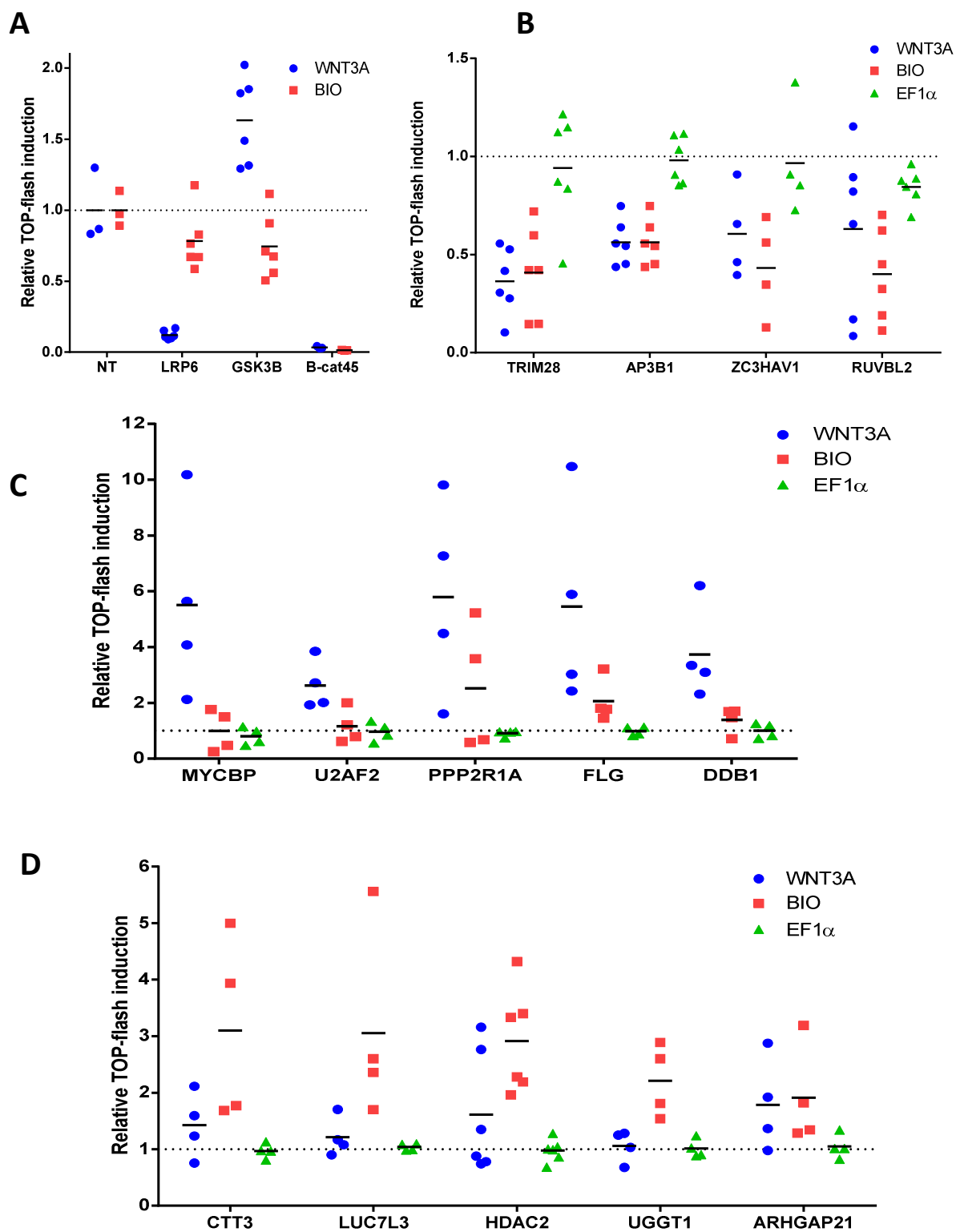


Figure IV.3. Functional epistasis shRNA analysis of the CTNNB1 modulated interactome using CTNNB1-dependent TCF/LEF-promoter driven reporter activity. (A) Fold induction of TOP-flash promoter in HEK 293T cells transduced with shRNA-expressing lentiviruses targeting LRP6, GSK3 β or CTNNB1 and treated with media containing WNT3A or with BIO. Results obtained with every shRNAs and replicates for each gene were combined and presented as relative TOP-flash fold induction, where shRNA NT is normalized to 1. Screening of the 133 shRNAs targeting 27 CTNNB1 interactors resulted in the identification of 14 genes that specifically modulate the CTNNB1-dependent TOP-flash activity without affecting expression from the control EF1 α promoter. The inhibition profile of each shRNA in the epistatic study allowed classification into three functional groups within CTNNB1/WNT canonical pathway. (B) Positive regulators acting downstream of the CTNNB1 destruction complex.(C-D) Negative regulators acting on both WNT3A and BIO stimulations, but with accentuated phenotype on WNT3A (C) or BIO (D).

The second group encompasses five negative regulators (NR) acting upstream the CTNNB1 destruction complex (MYCBP, U2AF2, PPP2R1A, FLG and DDB1), since their KD increased transcriptional activity of TOP-Flash following WNT3A treatment while had no or minimum effect upon BIO treatment (**Figure IV.3C**). The third group is composed of five negative regulators acting downstream the destruction complex (CTT3, LUC7L3, HDAC2, UGGT1 and ARHGAP21), since their KD led to an accentuated phenotype following BIO treatment versus WNT3A treatment (**Figure IV.3D**). Overall, the combined approach identified 14 CTNNB1 interacting proteins regulating WNT activation at various steps of the pathway (**Figure IV.S4**).

IV.4.3 DDB1 negatively regulates the WNT signaling pathway

Our MS-MS analysis identified DDB1 as an interactor that is reduced upon GSK3 inhibition, and our functional screen mapped it as a NR that represses the transcriptional activity of endogenous CTNNB1 by acting upstream of the destruction complex. Furthermore, DDB1 functions as a component of numerous distinct CUL4-based E3 ubiquitin-protein ligase complexes, and was described as part of an aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligand-dependent

mechanism of proteasomal degradation of CTNNB1 leading to suppression of intestinal carcinogenesis in a mouse model [543]. To substantiate the physiological significance of the interaction between DDB1 and CTNNB1, we performed immunoprecipitation studies of endogenous CTNNB1 in HEK293T and A549 cells who have a functional WNT pathway. The interaction of CTNNB1 with endogenous DDB1 was first validated in resting cells (**Figures IV.4A and 4B**). This interaction is reduced upon WNT3A activation and BIO treatment confirming its lack of binding to the CTNNB1 unphosphorylated active form possibly due to a preferential binding to a CTNNB1 phosphorylated form. This data is in agreement with the results obtained with the LC-MS-MS analysis. The reciprocal immunoprecipitation of ectopically expressed DDB1 further confirmed the interaction with endogenous CTNNB1 (**Figure IV.4C**). Interestingly, an interaction between endogenous CTNNB1 and DDB1 is also detected in SW480 and HCT116 colorectal cancer cells that are expressing constitutively active CTNNB1 (**Figure IV.S5A and IV.5B**).

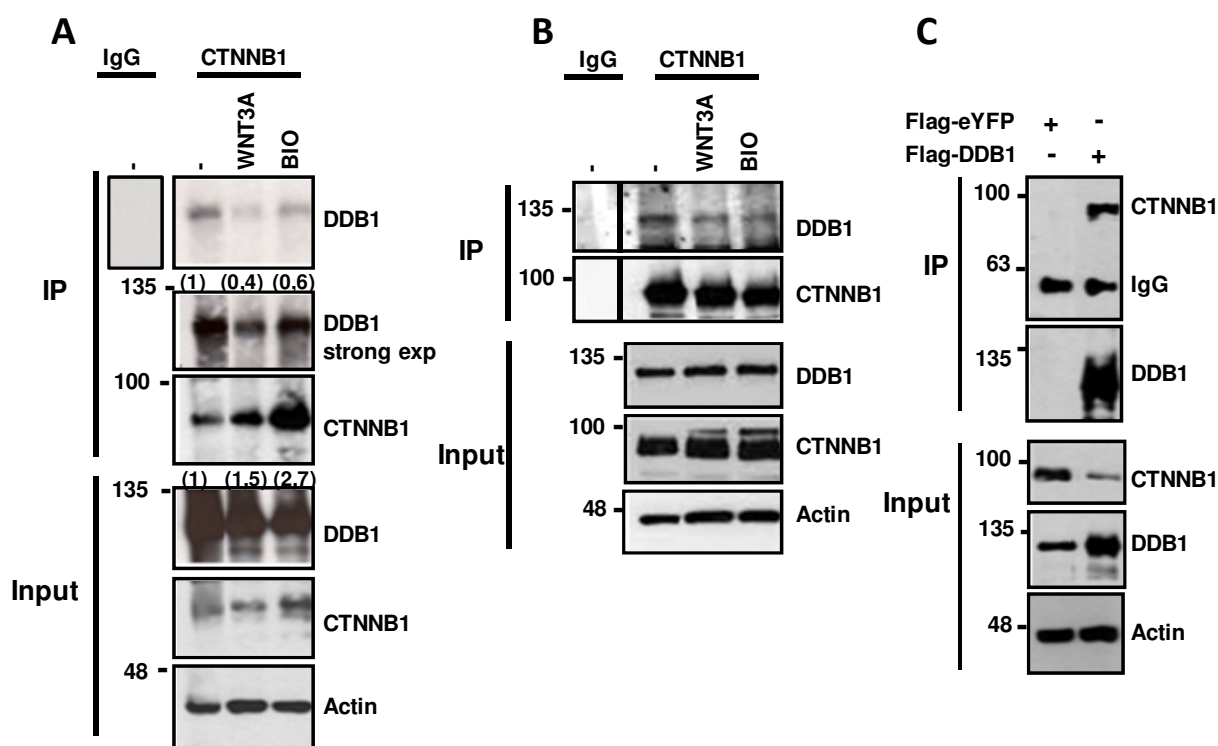


Figure IV.4: Interaction between DDB1 and CTNNB1. (A) Co- Immunoprecipitation of endogenous DDB1 with CTNNB1 in HEK293T cells and (B) in A549 cells. Cells extracts were prepared following 20 hours of treatment with WNT3A conditioned medium (CM) or BIO (5 μ M) before being subjected to immunoprecipitation with monoclonal antibody against endogenous CTNNB1. Whole cell lysates were probed for input. The western blot band intensities were measured with ImageJ software. DDB1 and CTNNB1 protein levels were normalized to no treated condition. (C) Co-immunoprecipitation of endogenous CTNNB1 with DDB1 in HEK293T cells transfected with Flag-MCS or Flag-DDB1 for 48 hours. Cell lysates were subjected to IP with anti-Flag antibody followed by immunoblotting with antibodies against total CTNNB1 and DDB1. Whole cell lysates were probed for input.

We then validated the functional properties of this interaction using reporter assays with TOP-Flash. Our shRNA silencing screen analysis mapped DDB1 functional role upstream the destruction complex (**Figure IV.3C**). Indeed, WNT3A-dependent stimulation of TOP-Flash activity is significantly increased by the KD of DDB1 in contrast to the GSK3 inhibitor-mediated TOP-Flash activation that is slightly reduced following BIO treatment with two independent shRNAs (**Figure IV.5A**). To further confirm that DDB1 is mainly acting

upstream of the destruction complex, we performed TOP-flash assays in DDB1 KD cells following ectopic expression of a phosphodeficient mutant form of CTNNB1 (S33A S37A T41A; referred to here as CTNNB1 3A), mimicking the specific inhibition of GSK3-dependent phosphorylation of CTNNB1. Indeed, we showed that the KD of DDB1 with two shRNAs had no effect on TOP-Flash activity in response to the stimulation (**Figure IV.5A**). Conversely, overexpression of DDB1 decreased TOP-Flash activity in a dose dependent manner following WNT3A stimulation distinctly to overexpressed β -TrCP (**Figure IV.5B**).

We next examined whether DDB1 contributes to the degradation of CTNNB1 as part of a CUL4 E3 ubiquitin-protein ligase complex to explain its NR phenotype. We first showed that the steady-state levels of CTNNB1 protein are enhanced upon DDB1 depletion in resting HEK293T cells (**Figure IV.5C**), while these levels are reduced with overexpression of DDB1 (**Figure IV.4C**). Similar effects are observed in cervical-derived HeLa DDB1 KD cells (**Figure IV.S6**). The constitutive ubiquitination of CTNNB1 in the absence of WNT stimulation is executed by the cullin dependent system SCF (Skp1-Cul1-F box protein) where the F-box protein is β -TrCP. The system CUL4-DDB1 is also part of the family of cullin-RING E3 ubiquitin ligases (CRLs) that are directly regulated by NEDD8 activating enzyme (NAE). NEDDylation of cullins results in conformational changes that are critical for their ligase activity [549]. To bring evidences for the contribution of a CUL4-DDB1 system in the regulation of CTNNB1 degradation, we took advantage of MLN4924, which is a novel small molecule inhibitor of NAE that is under several clinical trials for cancer therapy [550]. In the absence of WNT stimulation, treatment with MLN4924 increased the TOP-FLASH activity in a dose dependent manner until saturating the pathway with doses greater than 500nM (**Figure IV.5D**). This is expected as MLN4924 treatment abrogated SCF activity on CTNNB1

ubiquitination and thus its degradation. WNT activation also suppresses CTNNB1 ubiquitination by SCF such that a cumulative effect of non saturating doses of MLN4924 with WNT3A stimulation is expected on the stabilization of CTNNB1 and induction of TOP-FLASH activity. Indeed, MLN4924 effect on TOP-Flash enhanced activity is increased following WNT3A stimulation. More interestingly, the KD of DDB1 also enhanced CTNNB1 transcriptional activity of the non-saturating doses of MLN4924 in combination with WNT3A activation reaching the same maximum level at 1000nM for all conditions. This data supports a role of DDB1 and CRLs in regulating CTNNB1 protein levels, and suggest the involvement of a CUL4-DDB1 E3 ligase system in CTNNB1 degradation following WNT pathway activation. Subsequently, we evaluated whether DDB1 directly regulates endogenous CTNNB1 stability following WNT3A stimulation. To this end we measured the half-life of the cytosolic CTNNB1 extracted with digitonin-containing lysis buffer following inhibition of new protein synthesis by cyclohexamide (CHX) for 14 hours (**Figure IV.5E**). CTNNB1 protein levels and half-life were significantly increased in DDB1 silenced cells, suggesting that a CUL4-DDB1 system promotes CTNNB1 degradation in the presence of WNT3A stimulation.

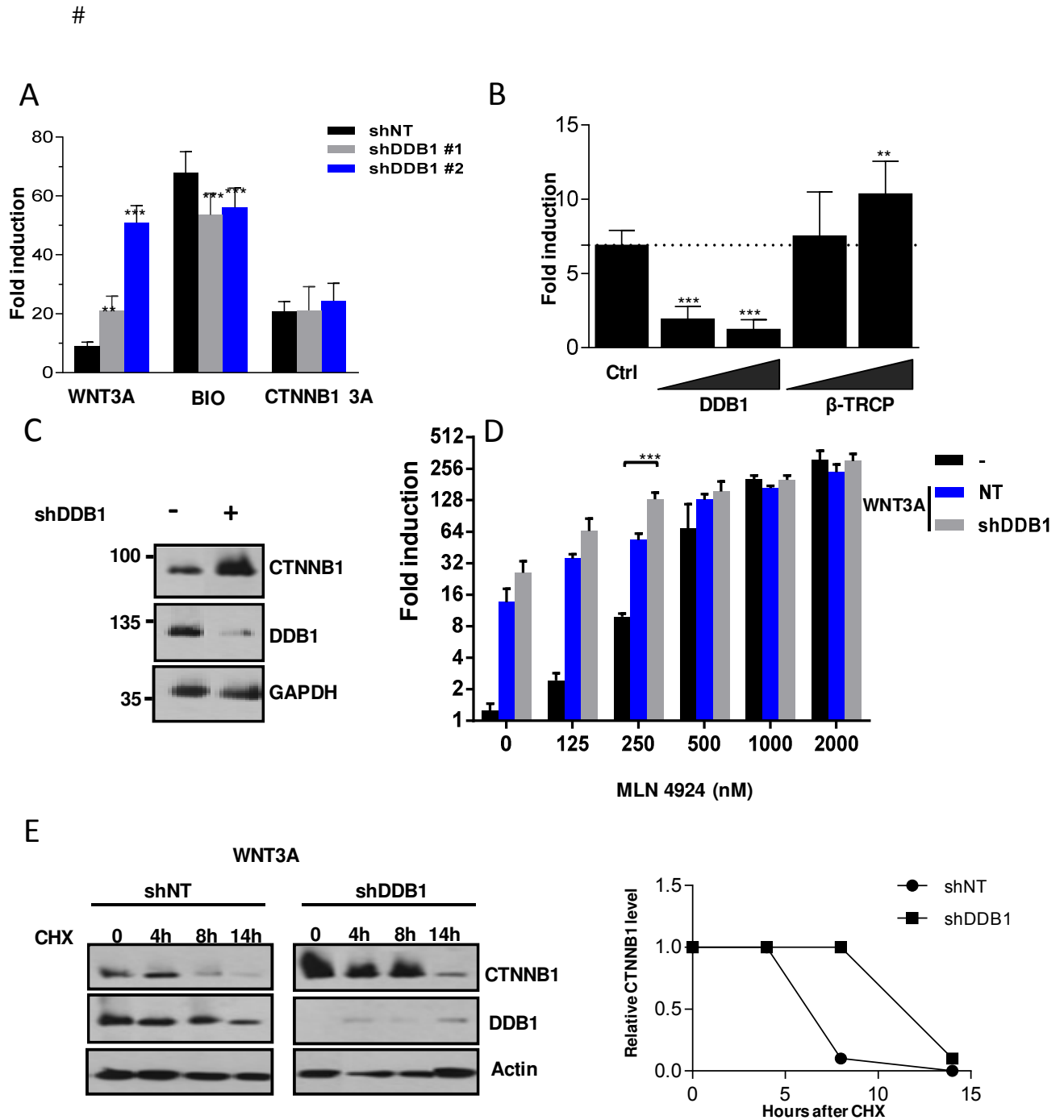


Figure IV.5: DDB1 reduced the abundance of CTNNB1. (A) TOP-Flash promoter induction in HEK293T cells transduced with lentivirus-expressing shRNA NT (control) or two shRNAs targeting DDB1 for four days and subjected to transfection with plasmid expressing CTNNB1 3A for 48 hours or to treatment with WNT3A (CM) or BIO (2.5μM) for 20 hours. (B) Fold induction of TOP-Flash reporter activity following dose-dependent transfection of DDB1 or β-TrCP (100 and 200ng) for 48 hours in WNT3A treated cells. (C) Immunoblot analysis of cytosolic CTNNB1 extracted with digitonin-containing lysis buffer in HEK293T

cells transduced with shRNA NT or shRNA DDB1 for four days. (D) Fold induction of TOP-Flash reporter in HEK293T cells transduced with lentiviruses-expressing shRNA NT or shRNA DDB1 for four days and subjected to WNT3A (CM) and MLN4924 treatments for 20 hours. (E) DDB1 destabilized cytosolic CTNNB1. Left panel, western blot of CTNNB1 extracted with digitonin-containing lysis buffer in HEK293T cells transduced with lentiviruses shRNA NT or shRNA DDB1 for four days. Cells were harvested at the indicated times following inhibition of new protein synthesis by cyclohexamide (CHX). Right panel, quantitation of digitonin extracted CTNNB1 normalized to the loading control and expressed relative to 0h.

To specifically demonstrate the involvement of a CUL4 E3 ubiquitin-protein ligase complex, we first showed that ectopically expressed CUL4A co-interacts with DDB1 and CTNNB1 as detected in the co-immunoprecipitation of anti Flag-CTNNB1 protein (**Figure IV.S7A**). Overexpression of CUL4A further decreases TOP-Flash activity, and has no additional effects when combined with DDB1 overexpression suggesting that CUL4A and DDB1 are cooperating together in promoting CTNNB1 degradation (**Figure IV.S7B**). Finally, to address whether DDB1 is directly involved in the ubiquitination of CTNNB1, we immunoprecipitated endogenous CTNNB1 following expression of HA-tagged ubiquitin (HA-Ub) in HEK293T cells. We found that DDB1 depletion decreases the polyubiquitination of CTNNB1 over the one of WNT3A stimulation (**Figure IV.6A**), while DDB1 overexpression conversely increases its levels (**Figure IV.6B**). In addition, we demonstrated the ability of ectopically expressed CUL4A to polyubiquitinate CTNNB1 as observed with overexpression of β -TrCP used as a control (**Figure IV.S7C**). These findings identified DDB1 as a negative regulator of the WNT signaling pathway and suggest the contribution of a cytoplasmic CUL4A-DDB1 E3 ubiquitin-protein ligase complex to promote CTNNB1 ubiquitination and to reduce its half-life upon WNT3A activation.

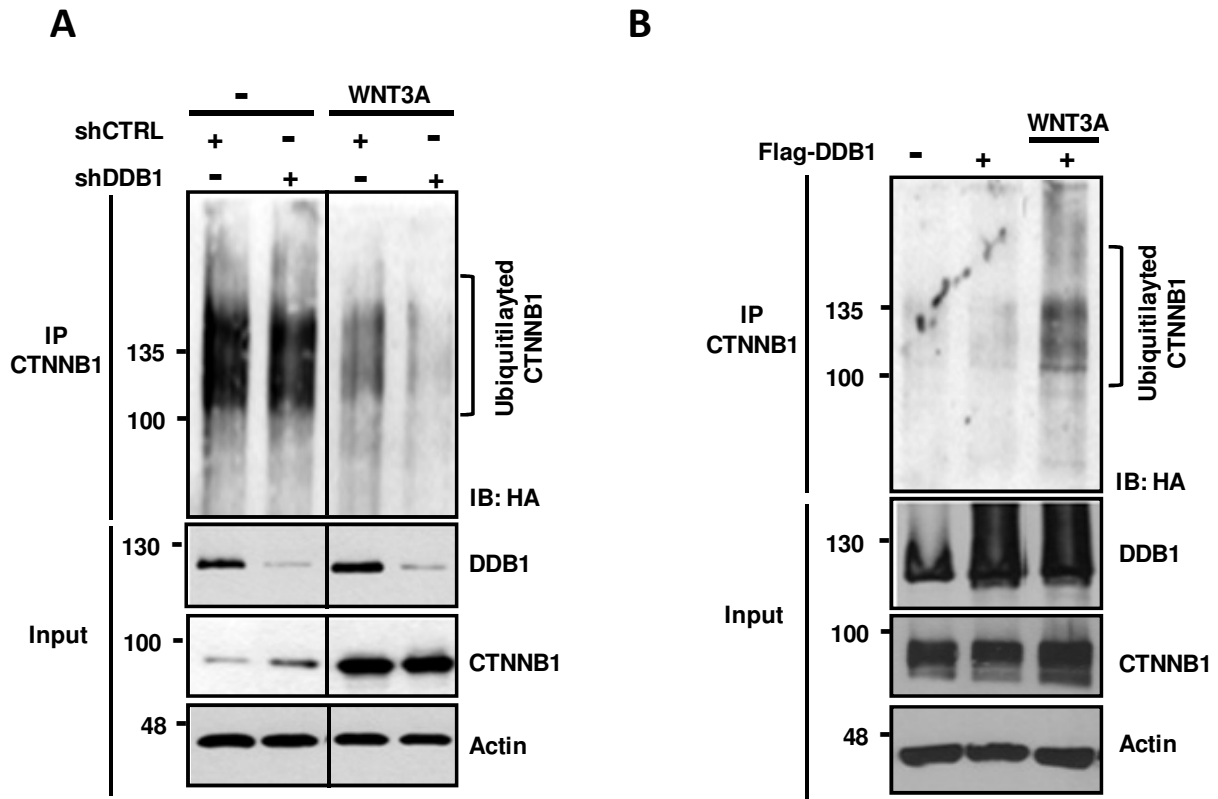


Figure IV.6: DDB1 ubiquitinates CTNNB1. (A) *In vivo* ubiquitination assay performed in HEK293T cells transduced with lentivirus-expressing shRNA NT or shRNA DDB1 for four days, and transfected with HA-ubiquitin for 48 hours. Cells were treated with WNT3A CM (20 hours) and MG132 (10 μ M for 4 hours) prior to lysis and were then subjected to immunoprecipitation with CTNNB1 antibody followed by anti-HA immunoblot analysis. (B) HEK293T cells were transiently transfected with HA-ubiquitin and empty vector or FLAG-DDB1. Experiments were performed as described for A but without MG132 treatment.

IV.4.4 DDB1 promotes the stabilization of CTNNB1 in SeV-infected cells and inhibition of IFNB1 production

SeV infection triggers the stabilization of CTNNB1 resulting in the negative feedback inhibition of IFNB1 production [551]. The antiviral response is also reduced by the pharmacological action of GSK3 inhibitors, which can be restored in CTNNB1 KD cells further validating a specific role of CTNNB1 in the negative regulation of antiviral innate immunity. Interestingly, DDB1 has been reported to affect the replication of several viruses

including HCV [552], HBV [553], HIV [554], SV5 (Simien Virus 5)[555] and HPAI (Highly pathogenic avian influenza A)[556].

How DDB1 affects the life cycle of these viruses is still unclear but DDB1 overexpression was showed to potentiate HCV replication while its KD to dramatically inhibit HCV replication [552]. We hypothesized that DDB1 contributes to the inhibition of IFNB1 production in virus-infected cells by modulating CTNNB1 protein levels. We first validated the endogenous interaction of DDB1 with CTNNB1 in HEK293T and SW480 cells, and showed that the interaction is decreased following SeV infection (**Figure IV.7A** and **7B**). We then investigated the functional properties of this interaction in regulating antiviral response of HEK 293T following SeV infection (**Figure IV.S8A** and **8B**). We showed that DDB1 KD increased SeV-mediated pIFNB1-LUC expression (**Figure IV.S8A**) and the mRNA levels of IFNB1 (**Figure IV.7C**) and IFIT1 (**Figure IV.7D**) comparably to CTNNB1 KD. In addition, the KD of DDB1 in combination with CTNNB1 do not further increase the endogenous production of IFNB1 or IFIT1 when compared to the KD of DDB1 or CTNNB1 alone, suggesting that both proteins are acting jointly in the same regulatory pathway.

Conversely, DDB1 overexpression significantly reduced the reporter activity of pIFNB1-LUC in a dose-dependent manner (**Figure IV.S8B**). To assess a regulatory role of DDB1 on CTNNB1 protein levels, we performed *in cellulo* ubiquitination assays of endogenous CTNNB1 by expression of HA-Ub in cells infected with SeV and treated with the cell-permeable MG132 proteasome inhibitor (**Figure IV.7E**). We detected a significant reduction of CTNNB1 ubiquitination that correlates with the increased CTNNB1 protein levels observed upon SeV infection. Very interestingly, an almost complete recovery of CTNNB1 ubiquitination is detected in DDB1 KD cells correlating with a reduction of CTNNB1 protein

levels. The data demonstrate that DDB1 upon its dissociation from a CTNNB1 protein complex promotes the stabilization of CTNNB1 by blocking its ubiquitination in SeV-infected cells, and contributes to the negative regulation of virus-mediated IFNB1 production.

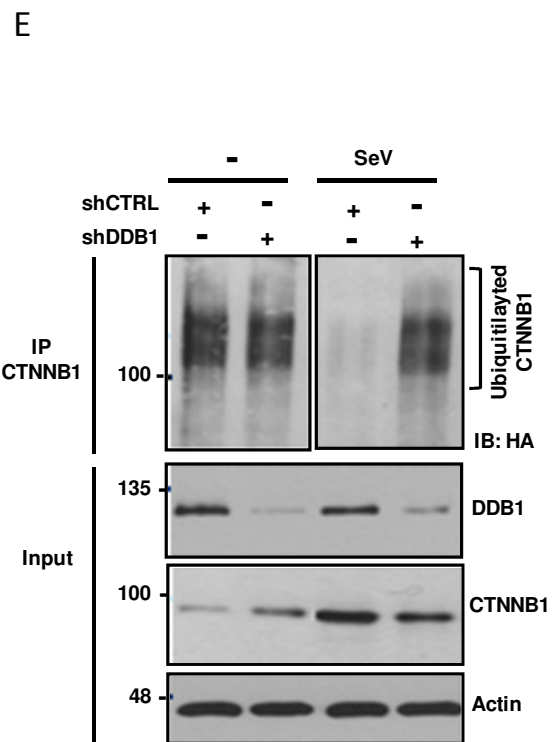
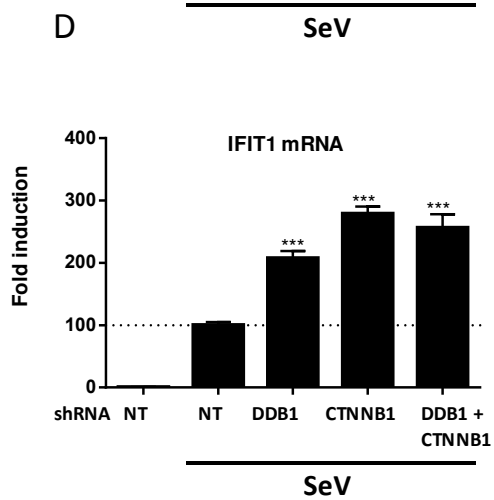
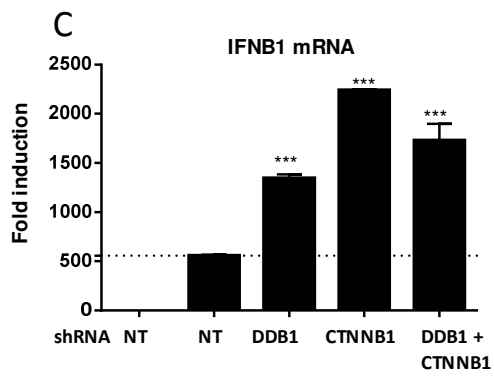
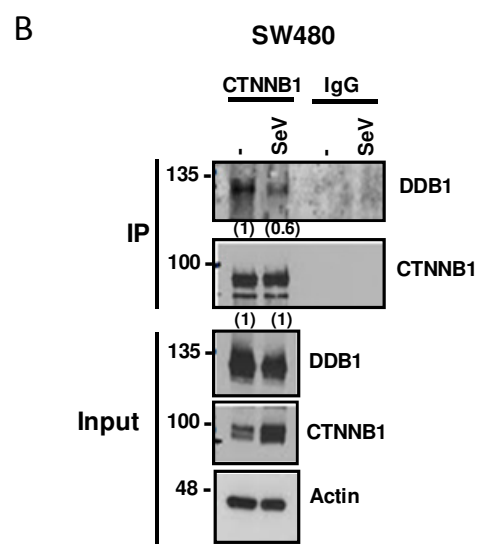
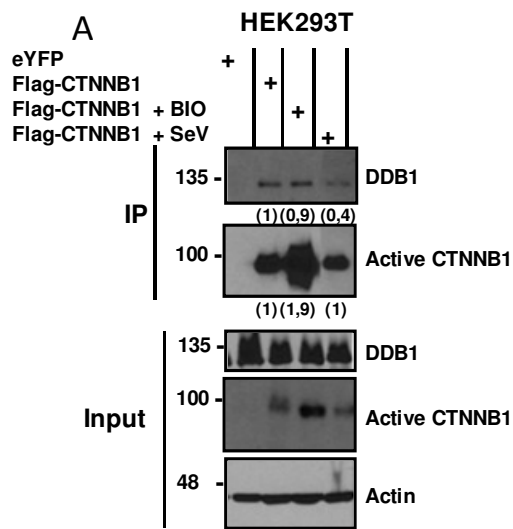


Figure IV.7: DDB1 stabilized CTNNB1 following SeV infection. (A) 293T cells were transfected either with FLAG-eYFP (control) or FLAG-CTNNB1 expressing plasmids for 48 hours. The whole-cell lysates were prepared 16 hours following treatment with GSK3 inhibitor BIO (5 μ M) or SeV infection before being subjected to immunoprecipitation directed against FLAG. Cell extracts and immune complexes were analyzed by Western blot. (B) Co-Immunoprecipitation of endogenous DDB1 with CTNNB1 in SW480 cells. Cell extracts were prepared following 16 hours of SeV stimulation. (C-D) Fold induction of IFNB1 (C) and IFIT1 (D) mRNA levels in HEK 293T cells transduced with lentivirus-expressing shRNA NT or shRNAs targeting DDB1, CTNNB1 and combination of DDB1 + CTNNB1 for four days and then subjected to SeV infection for 16 hours. (E) *In vivo* ubiquitination assay performed in HEK293T cells with or without DDB1 depletion by shRNA and subjected to SeV infection for 16 hours. Experiment was performed as described in figure 6A.

IV.5 Discussion

To investigate a CTNNB1 interactome upon activation of the WNT signaling pathway by GSK3 inhibition, we used a combined approach of IP-MS/MS proteomic and gene silencing screening of newly identified partners in cells expressing a TCF/LEF promoter-driven reporter gene (TOP-Flash). The quality of our IP-MS/MS study was first demonstrated by the identification of stable interactions between FLAG-CTNNB1 and core proteins of the destruction complex: AXIN, GSK3 and APC (**Figure IV.S1A**). The observation that these three interactions are not affected by GSK3 inhibition is in agreement with a recent study showing that the destruction complex stay assembled even following WNT signaling [297]. Our study also identified seven proteins already characterized as direct CTNNB1 interactors, but for which we now provide evidence that they preferentially bind to a stabilized unphosphorylated CTNNB1 for enriched proteins (RUVBL2, YWHAQ, IQ6AP1 and ARHGAP21) [545, 547, 557] or are depleted from this active form possibly due to a preferential binding to a phosphorylated CTNNB1 (RB1CC1, DDB1 and CTNNBIP1) [543, 544, 558]. In this study, we found 39 interactions including 31 novel CTNNB1 partners that are significantly modulated by the GSK3 inhibitor BIO and overexpression of CTNNB1

protein in HEK293T cells. Among those partners, 10 proteins are significantly reduced from CTNNB1-associated complexes emphasizing a dependency of GSK3 activity in modulation of these interactions, as BIO has been shown to be quite selective to GSK3 kinase activity [559]. Interestingly, a similar IP-MS/MS proteomic approach when applied to SeV-infected cells (SES and DL personal communication) also reveals interactors that are reduced of CTNNB1-associated protein complexes upon virus infection including DDB1 (see below). We further validated a functional role of CTNNB1 interactors within the WNT pathway by modulating CTNNB1-mediated TCF/LEF transcriptional activity, and determined the positioning of 14 proteins (including 10 new partners) that specifically modulate CTNNB1-dependent TOP-flash activity without affecting expression of control *EF1 α* promoter-driven reporter gene. According to the modulation patterns observed in KD cells following WNT3A activation from the frizzled (FZD) receptor at the membrane or following activation from GSK3 inhibition within the destruction complex, we classified these 14 interactors in three functional groups within the WNT canonical pathway (**Figure IV.3B, 3C and 3D**). A schematic representation of the regulatory role of these newly identified modulated interactors of the CTNNB1 in the WNT canonical pathway is presented in (**Figure IV.S4**). Most of the identified interactors are NR of the WNT signaling pathway by acting either upstream of the CTNNB1 destruction complex (U2AF2, MYCBP, PPP2R1A, FLG and DDB1) or downstream of the destruction complex (CCT3, LUC7L3, HDAC2, UGGT1 and ARHGAP21). Few interactors were found to positively regulate the pathway and all are acting downstream of the destruction complex (TRIM28, AP3B1, ZC3HAV1 and RUVBL2). Interestingly, RUVBL2 (ATPase and putative DNA helicase) is the only known interactor among the group of PR, which was found to be overexpressed in the vast majority of human hepatocellular carcinoma (HCCs) and related to

the aggressiveness of the tumor [560]. Moreover, its overexpression enhances tumorigenicity while silencing RUVBL2 in HuH7 HCC cells reduced cell growth arguing for a major role of RUVBL2 in liver carcinogenesis. In our study, RUVBL2 and transcription intermediary factor 1-beta (TIF1B) encoded by TRIM28 gene known to interact together [561] were both identified as PR that are enriched interactors upon GSK3 inhibition (see protein network of **Figure IV.2D**) suggesting the existence of a newly CTNNB1-associated regulatory protein complex. More studies will be required to confirm the existence and function of such protein complex (RUBVL2, TRIM28, CDK9) in positively regulating the WNT signaling pathway. We also identified RB1CC1 (also known as FIP200), which is a known interactor of CTNNB1 characterized as a negative regulator promoting its ubiquitination [544]. Importantly, RB1CC1 is able to interact with the APC/AXIN destruction complex and its induced degradation of CTNNB1 was dependent on GSK-3 β -mediated phosphorylation. Our data is also in agreement with the reported study as BIO treatment reduces RB1CC1-CTNNB1 interaction, providing additional confirmation of GSK-dependent modulation of the interaction and underscoring the power of our proteomic approach.

CTNNB1 degradation is a fundamental step in the maintenance of the balance between normal and malignant cells behavior, since constitutive activation of CTNNB1 leads to tumorigenesis. Identification of many E3 ubiquitin ligases targeting CTNNB1 for degradation in a WNT-dependent or independent manner provide broader therapeutic avenues for targeting cancers caused by aberrant constitutive activation of CTNNB1. In this study, we showed that DDB1 promotes CTNNB1 degradation, reducing its steady-state levels in inactivated cells and decreasing its half-life following WNT3A activation. Our data support the constitutive interaction of a subcellular fraction of DDB1 with CTNNB1 that is reduced by WNT3A

activation and suggest a dissociation of DDB1 from the complex as a direct molecular response for WNT stimulation, and prior to inhibition of GSK3 activity upon activation of the pathway. Functional RNAi screen is in agreement with this data, since DDB1 is mapped as a NR upstream the destruction complex. The latter further suggests that DDB1 is not targeting an active CTNNB1 pool that localizes predominantly in the nucleus. Upon WNT3A activation, DDB1 then cooperates with CUL4A to polyubiquitinate cytosolic CTNNB1 and reduces its half-life in a GSK3 dependent manner since inhibition of its kinase activity or ectopic expression of phosphodeficient CTNNB1 (CTNNB1 3A) abrogates any contribution to the regulation of the WNT pathway. The mechanisms by which WNT inhibits the destruction complex are partially understood. Recent works from Clevers et al. propose that WNT signaling suppresses CTNNB1 ubiquitination by β -TrCP, leading to complex saturation by accumulation of the phosphorylated CTNNB1. Subsequently, newly synthesized CTNNB1 accumulate in a free cytosolic form and engage nuclear TCF transcription factors. Thus, the key step regulated by WNT is the suppression of β -TrCP recruitment to CTNNB1 or dissociation of β -TrCP from the complex and not the downregulation of GSK3 activity [297]. Our data are consistent with this model and suggest that DDB1 rather targets the phospho-CTNNB1 cytosolic pool sequestered in the destruction complex than newly synthesized CTNNB1 upon WNT3A activation. Recently, CTNNB1 phosphorylation by GSK3 has been shown as a mechanism through which GSK3 regulates several cellular processes, including mitosis [562, 563], cell migration [564], neuroepithelial integrity [565], neuronal excitability [566] and viral infection [331]. Our data suggest that a CUL4-DDB1 E3 ligase system is able to target phospho-CTNNB1 for degradation following WNT stimulation distinctly to β -TrCP.

Thus, such system could be activated under other stimulations, and therefore could regulate many physiological processes.

DDB1, CTNNB1 and SeV: Our data illustrate that a subcellular fraction of DDB1 interacts constitutively with CTNNB1, but this interaction is reduced following SeV infection. Furthermore, DDB1 KD enhances SeV-mediated production of IFNB1, which correlates with an increased CTNNB1 ubiquitination. This data strongly suggests that DDB1 dissociation from the complex is a direct molecular response for CTNNB1 stabilization in SeV-infected cells to negatively regulate IFNB1. But in this scenario, DDB1 is further promoting CTNNB1 stabilization rather than its degradation through an unknown mechanism. Previous studies have also reported a positive regulatory role of CUL4-DDB1 system of WNT/CTNNB1 signaling in hepatocellular carcinoma by protecting CTNNB1 from GSK3-mediated degradation, achieved through CUL4B-mediated epigenetic silencing of WNT pathway antagonists [567]. Additionally, it has been demonstrated that the KD of CUL4B inhibits proliferation and promotes apoptosis of colorectal cancer cells through suppressing of WNT/CTNNB1 pathway but the exact mechanism remains undetermined [568]. Interestingly, these studies are consistent with our preliminary observations that DDB1 KD in multiple colon cancer cells reduces dramatically CTNNB1 protein level (not shown). Furthermore, CUL4-DDB1 is able to target components of WNT signaling cascade including the CK1 α that is a component of the destruction complex [569], and PYGO which is a CTNNB1-TCF interacting nuclear factor [570]. Therefore, it is tempting to speculate that DDB1 dissociation from CTNNB1 complex following SeV infection is a direct result of CUL4-DDB1 targeting to another component of the destruction complex for ubiquitin-mediated degradation, leading to CTNNB1 stabilization. Thus, deeper mechanistic studies are needed to uncover DDB1-

mediated modulation of CTNNB1 protein levels following viral infection and in cancer cells. This should provide valuable data for novel antiviral agents that can pharmacologically modulate the innate immunity. Overall, our discovery that DDB1 differently regulate CTNNB1 protein levels upon canonical WNT activation and SeV infection reveal a novel regulatory degradation pathway of CTNNB1 (**Figure IV.8**), leading to new therapeutic strategies in many physiological conditions.

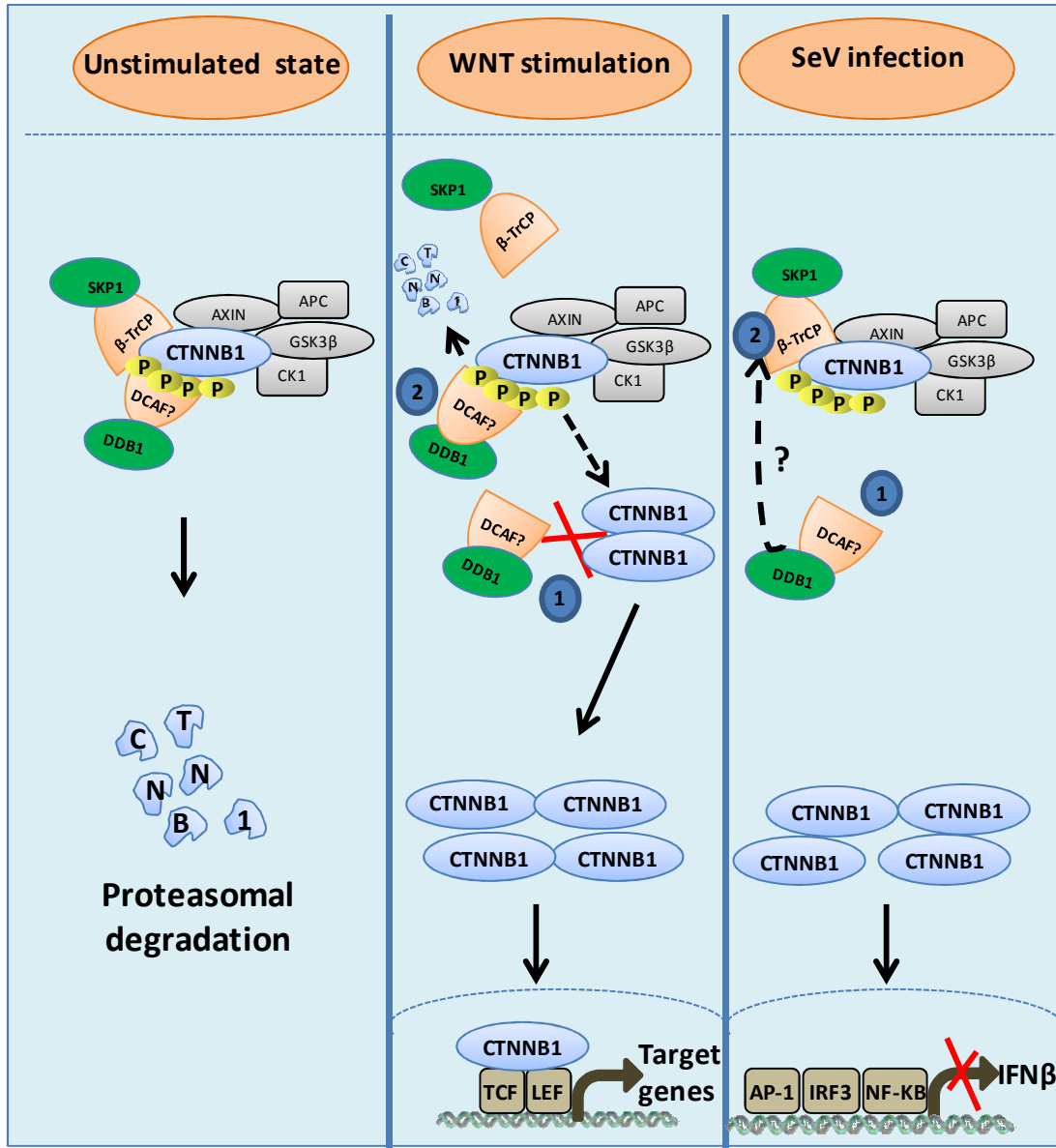


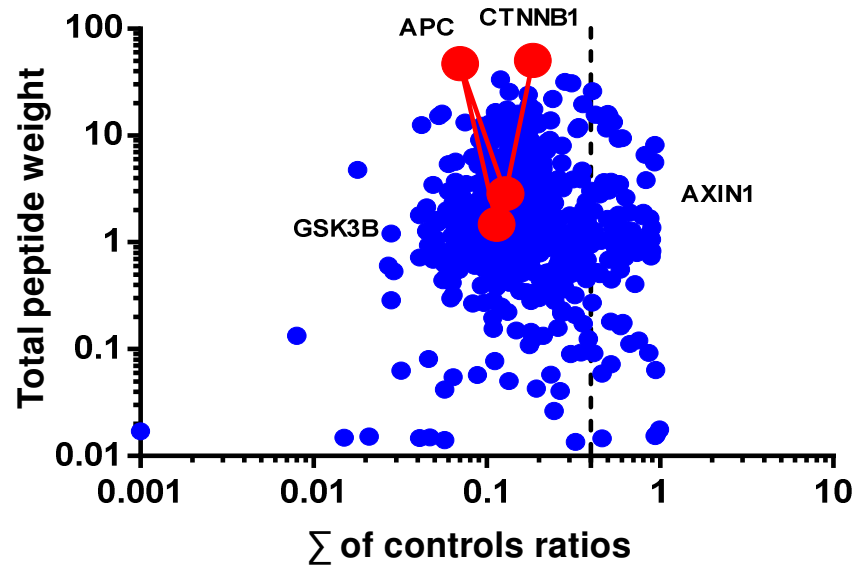
Figure IV.8: Model of DDB1 mediated degradation of CTNNB1. In unstimulated conditions, DDB1 is associated to CTNNB1 and contributes to its ubiquitination and degradation. Upon WNT stimulation, first DDB1 is dissociated from the stabilized form of CTNNB1 that is translocated to the nucleus and second DDB1 still regulate the stability of another pool of CTNNB1 that could be the phosphorylated form that is not targeted by β -TrCP dissociated from the complex. Following SeV stimulation, first DDB1 is dissociated from CTNNB1 and Second, DDB1 is protecting CTNNB1 from degradation by the destruction complex. The two events lead to the stabilization of a specific pool of CTNNB1 that negatively regulate the transcription of IFN β .

In summary, by combining interdisciplinary approaches of proteomic and functional technologies, we were able to identify novel interactors of CTNNB1 which is a multifunctional protein with key regulatory roles in most fields of biology. To appreciate the functional significance of each interactor, extensive mechanistic studies are required and will certainly pave the way to the development of novel clinical therapies in different human diseases.

IV.6 Supporting information

IV.6.1 Supplemental figures.

A



B

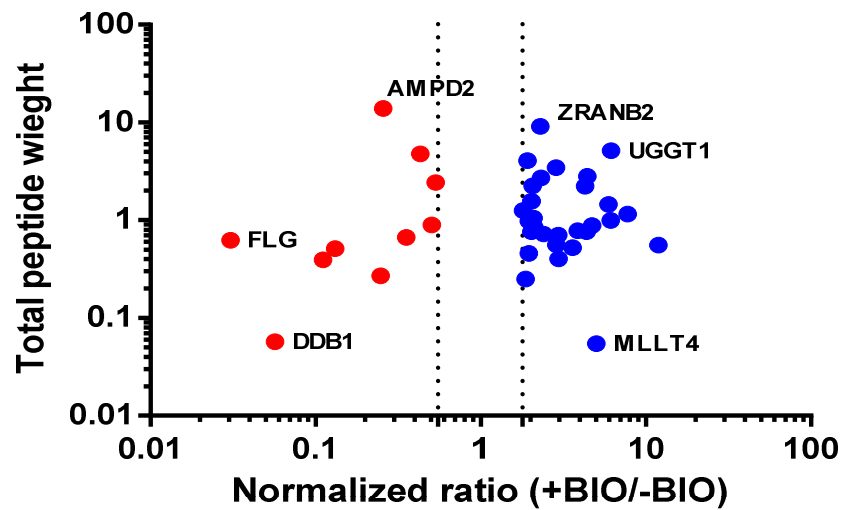
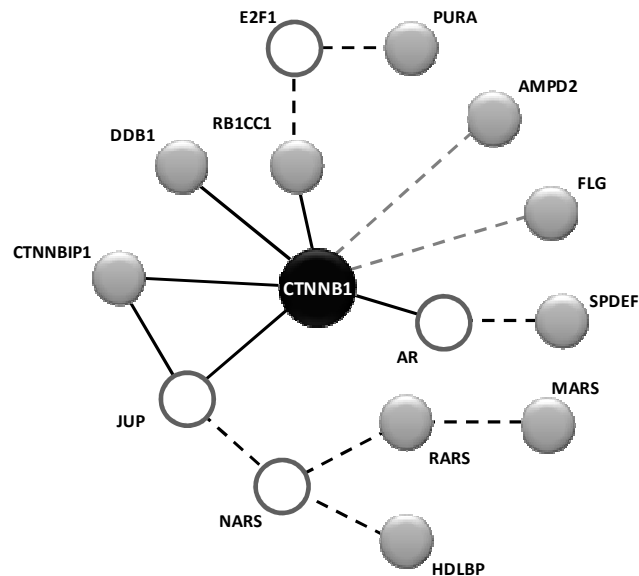


Figure IV.S1: CTNNB1 interactome. (A) Scatter plot presenting the sum of the two mock controls (FLAG-MCS, FLAG-eYFP) for the 586 identified proteins and total peptide intensities. Dotted line delimits proteins whose sum of the two mock controls did not exceed a threshold of 0.4. (B) Scatter plot reflecting proteins found to be depleted from the FLAG-CTNNB1 complex upon BIO treatment (ratio +BIO / -BIO < 0.55) colored in red. Proteins

found to be enriched in the FLAG-CTNNB1 complex upon BIO treatment (ratio +BIO / -BIO > 1.8) are colored in bleu.

A



B

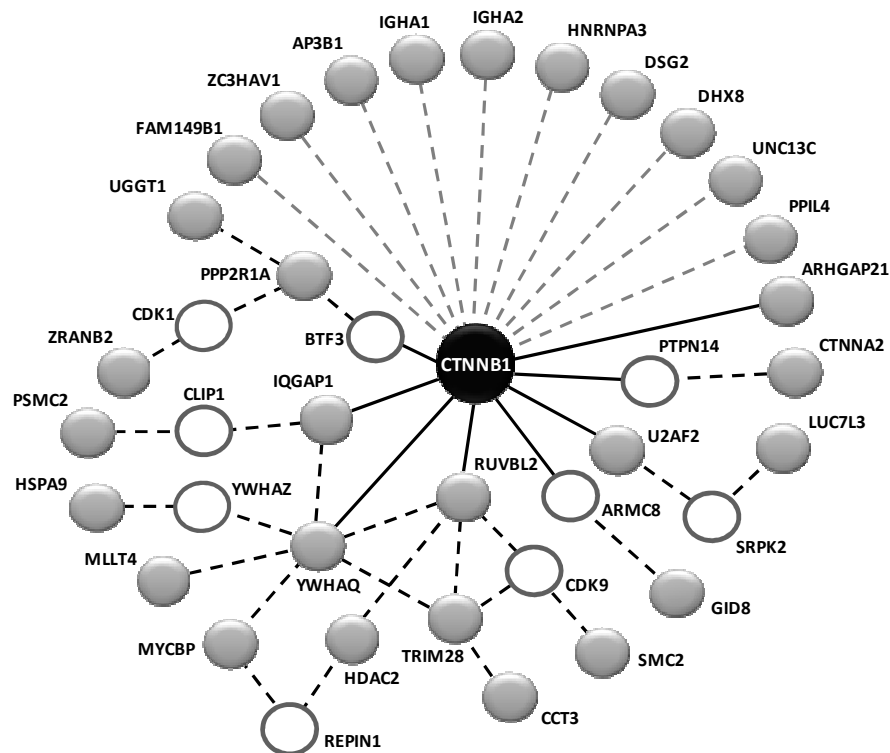


Figure IV.S2: Depleted or enriched CTNNB1 partners upon GSK3 inhibition. (A) Protein-protein interaction network were identified using GeneMANIA [540]. Grey circles represent depleted proteins identified by LC-MS/MS and white circles are intermediate proteins not present in the LC-MS/MS analysis, but allowing connection of interactors to

CTNNB1. Solid black lines represent known direct CTNNB1-interactors. Dotted lines represent new interactions that can (black) or can't (grey) be indirectly linked to CTNNB1 through intermediate interactors. (B) Protein-protein interaction network as described in (A), but for enriched proteins.

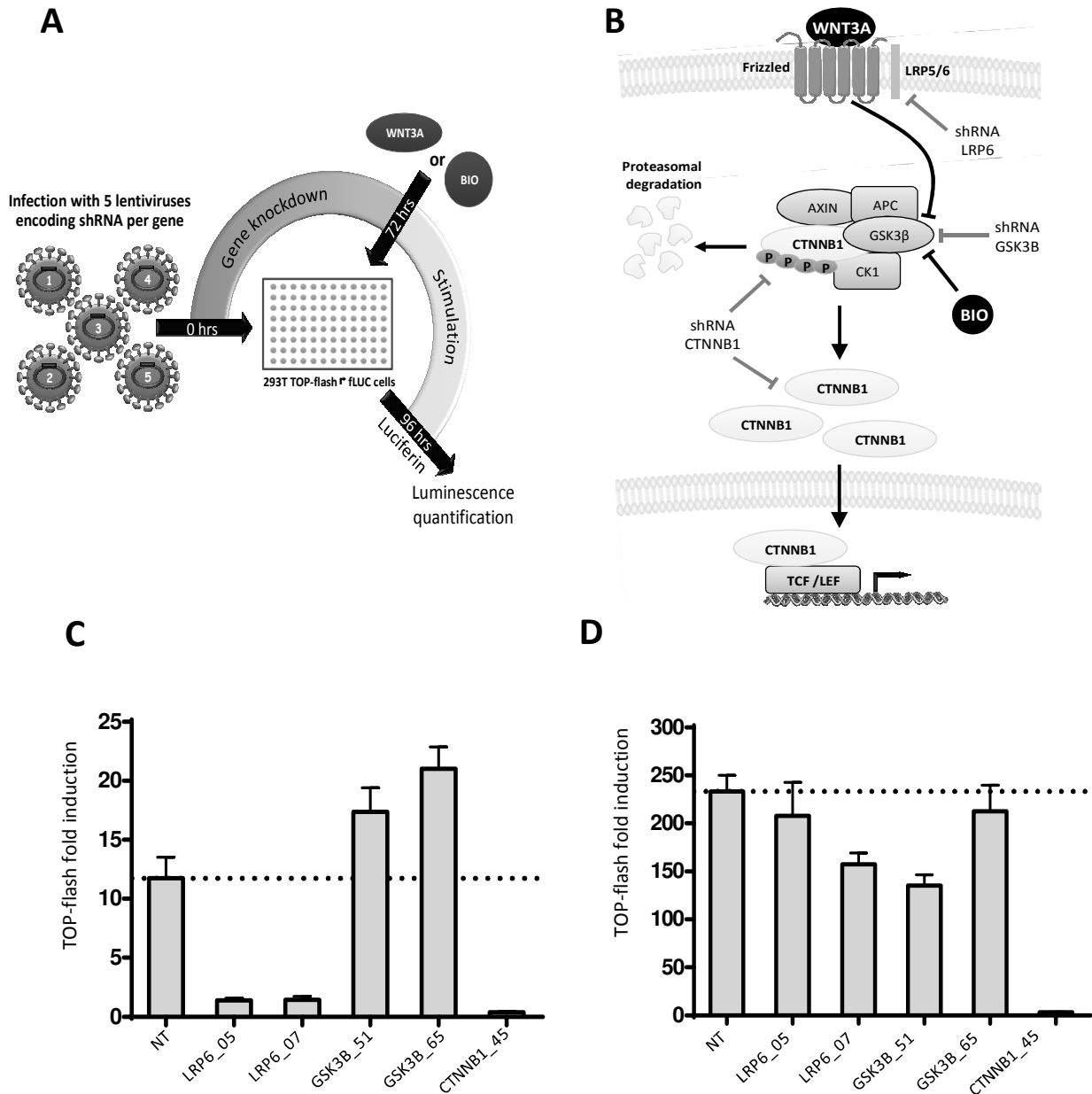


Figure IV.S3: Schematic representation of the shRNA screen. (A) HEK 293T cells were transduced with shRNA-expressing lentiviruses targeting 27 modulated CTNNB1 interactors (five independent shRNA per gene) in a 96-well format. After 72 hours, cells were transfected with CTNNB1-TCF/LEF dependent reporter: M50 Super 8xTOP-flash [2] and treated with media containing WNT3A or with GSK3B inhibitor (BIO) for sixteen hours before cell lysis

and firefly luminescence reading. (B) Schematic representation of the canonical WNT3A signaling pathway and CTNNB1 destruction complex. (C-D) Fold induction of TOP-flash promoter in HEK 293T cells transduced with shRNA-expressing lentiviruses targeting LRP6, GSK3B or CTNNB1 and treated with media containing WNT3A (C) or with BIO (D).

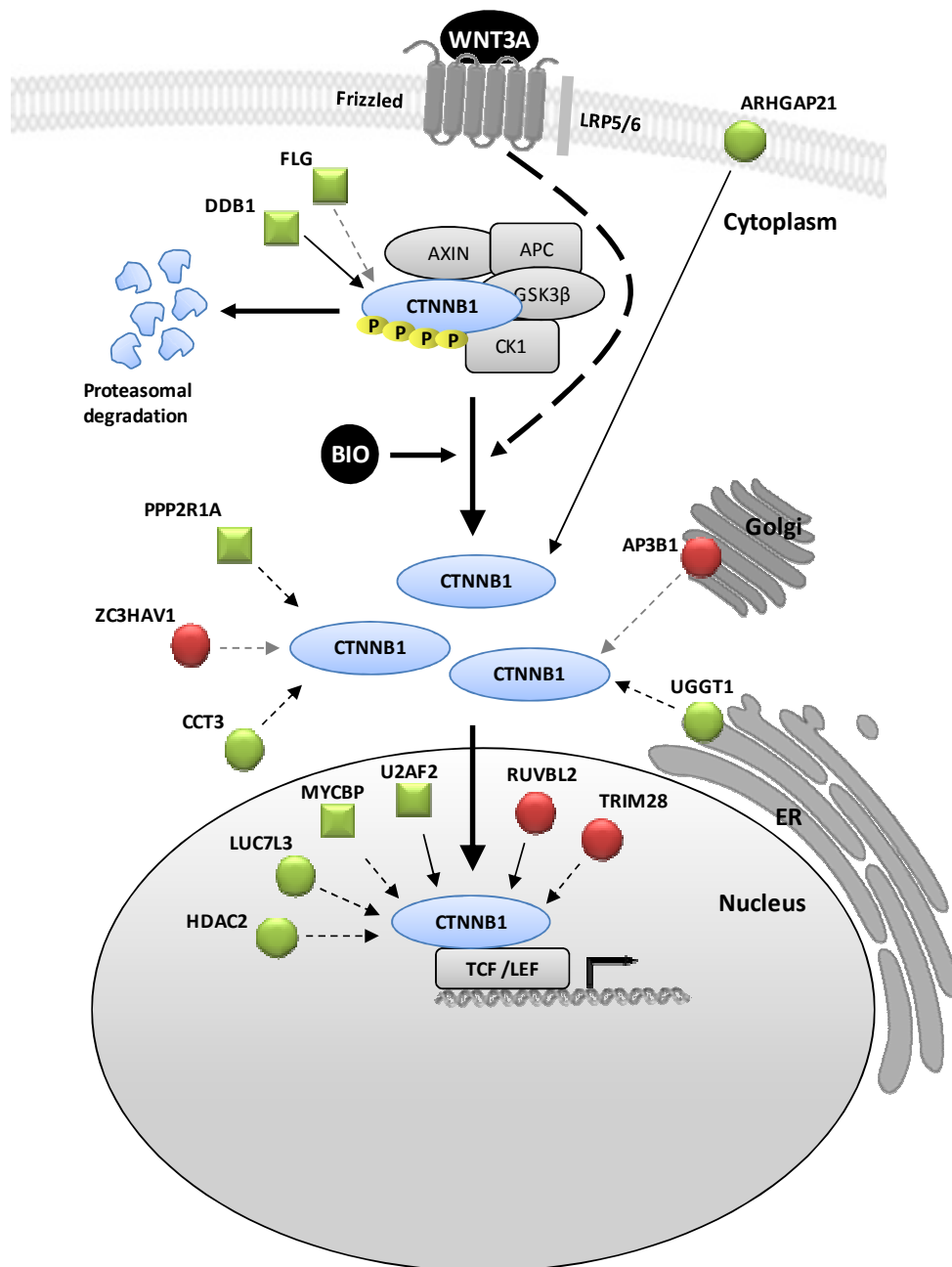


Figure IV.S4: Schematic representation of the regulatory role of newly identified modulated interactors of the CTNNB1 in the WNT canonical pathway. Mapping of the 14 CTNNB1 modulated interactors regulating TOP-flash promoter induction within a simplified WNT canonical pathway. Positive regulators and negative regulators of the signaling pathway are represented in green and red, respectively. Arrows indicate where the epistasis analysis positioned these interactors within the WNT pathway. Arrows orientation indicates if these interactors are depleted or enriched from the CTNNB1 complex following activation of the WNT pathway.

A

B

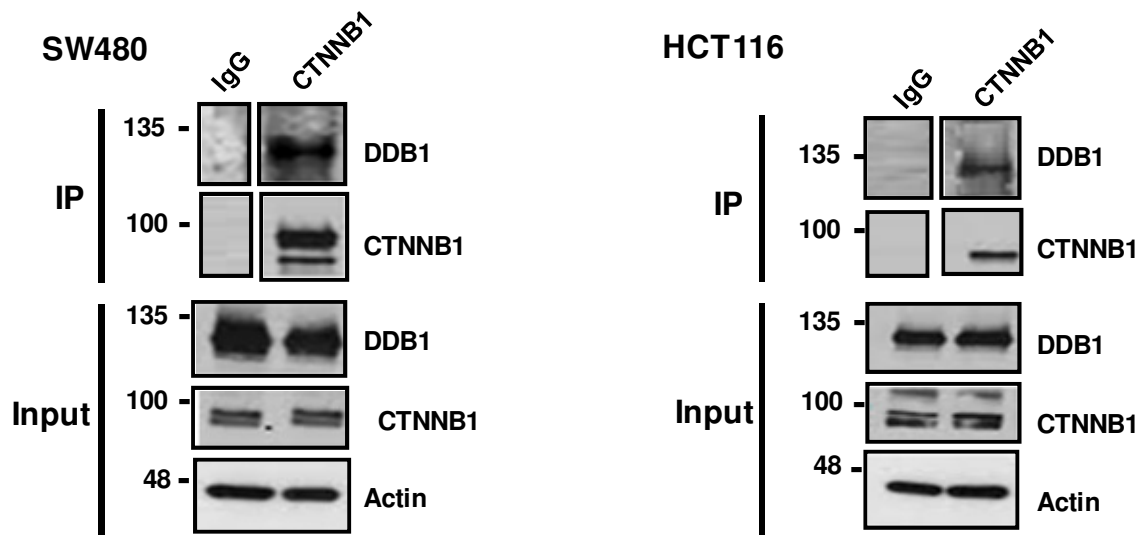


Figure IV.S5: Interaction between DDB1 and CTNNB1 in CRC cells. (A) Co-Immunoprecipitation of endogenous DDB1 with CTNNB1 in colon cancer cells SW480 and **(B)** HCT116 cells. Cells extracts were prepared and subjected to immunoprecipitation with monoclonal antibody against endogenous CTNNB1.

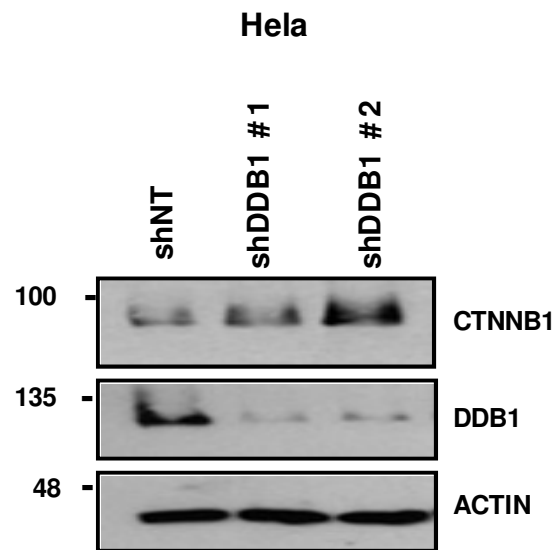


Figure IV.S6: Depletion of DDB1 increases CTNNB1 protein levels in Hela cells. Immunoblot analysis of CTNNB1 and DDB1 in HeLa cells transduced for four days with lentiviruses expressing shRNA NT or two independent shRNA targeting DDB1.

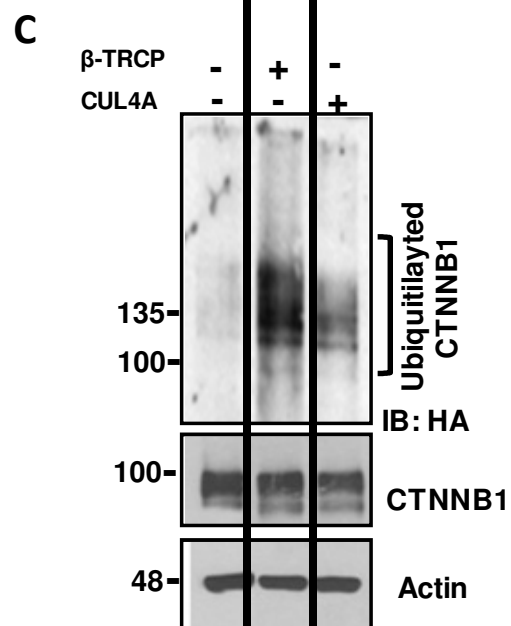
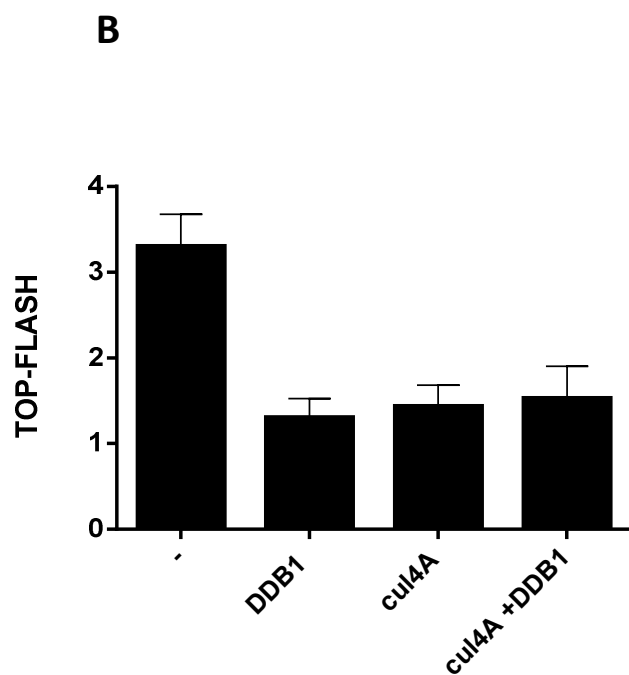
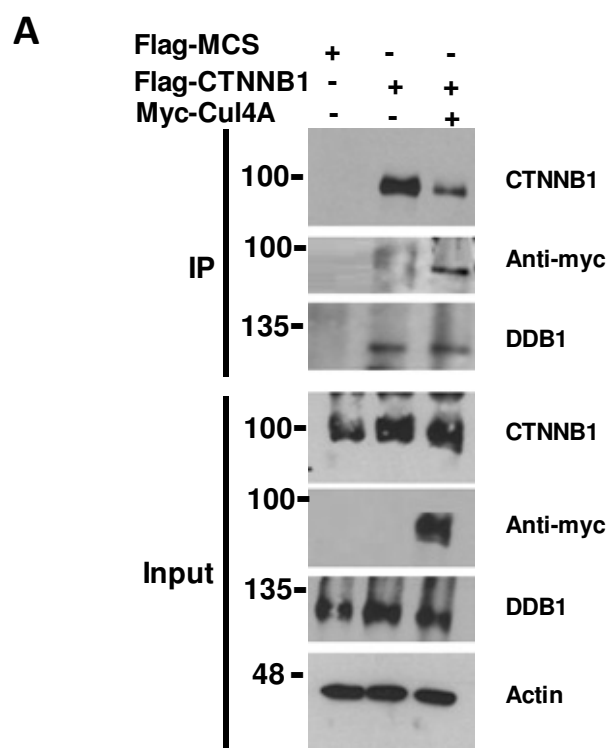
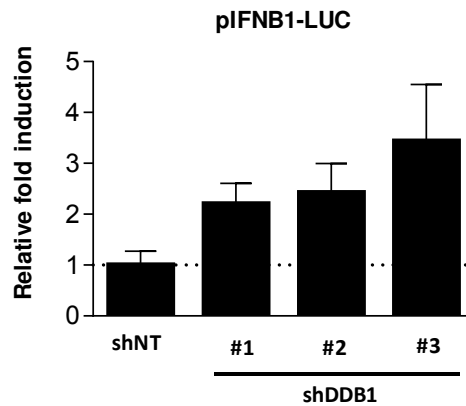


Figure IV.S7: CUL4A interacts and ubiquitinates CTNNB1. (A) 293T cells were transfected with plasmids expressing FLAG-MCS (control), FLAG-tagged CTNNB1 (10ug) alone or in combination with Myc-CUL4A (5μg each) for 48 hours. Cell lysates were subjected to IP with Flag antibody followed by immunoblotting with MYC, DDB1 and CTNNB1 antibodies. (B) Fold induction of TOP-Flash reporter activity following transfection of plasmids expressing DDB1 and CUL4A individually or in combination for 48 hours in WNT3A treated cells. (C) *In cellulo* ubiquitination assay performed in HEK293T cells transiently transfected with HA-ubiquitin, Flag-MCS (control) or plasmids expressing CUL4A or β-TrCP for 48 hours. Whole-cell lysates were then subjected to immunoprecipitation with CTNNB1 antibody followed by anti-HA immunoblot analysis

A



B

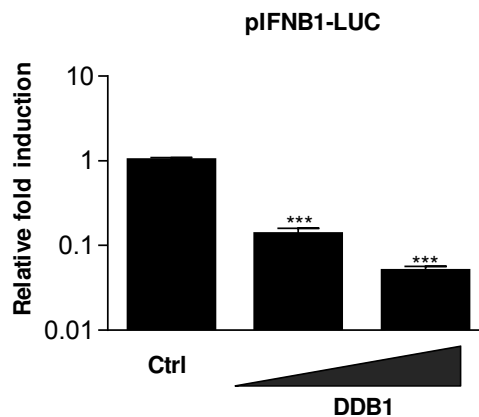


Figure IV.S8: DDB1 is a negative regulator of IFNB1 transcriptional activity. (A) IFNB1 promoter-driven luciferase activity in HEK 293T cells transduced with lentivirus-expressing shRNA NT or 3 shRNAs targeting DDB1 for four days and subjected to SeV infection for 16 hours (B) or following dose-dependent transfection of DDB1 (100 and 200ng) for 48 hours.

IV.6.2 Supplemental tables:

See annexe 2

Chapitre V

V. Discussion

V.1 Mise en contexte :

La découverte de nouveaux régulateurs des voies de signalisation de l'immunité antivirale est un domaine de recherche en pleine effervescence présentement. Ces recherches ont permis l'identification de plusieurs modulateurs de la voie RLRs, reflétant la complexité de cette régulation et suggérant l'existence d'autres régulateurs importants à découvrir. Ainsi, l'objectif de recherche principal de notre laboratoire est la découverte de nouveaux régulateurs de la voie RLRs et la caractérisation de leur mode d'action le long de la cascade de signalisation. Pour réaliser ces objectifs, notre laboratoire a opté pour une approche génomique en réalisant le premier criblage à haut débit aux ARNis qui évalue l'effet de la déplétion de plus que 15,000 gènes humains sur l'activité transcriptionnelle de l'IFNB1, en réponse à l'activation de la voie RLR par le VS. Par la suite une série de criblages secondaires a permis la confirmation fonctionnelle des candidats sélectionnés à partir du crible primaire et de localiser leur effet fonctionnel aux différents niveaux de la cascade de signalisation de l'expression RLR-dépendante d'IFNB1. Spécifiquement, nos travaux ont permis d'identifier WNT2B et WNT9B comme des régulateurs négatifs de l'expression d'IFNB1, et dont l'effet fonctionnel se localise dans les étapes tardives de cette signalisation. La caractérisation fonctionnelle de WNT2B et WNT9B a démontré qu'ils sont sécrétés suite à l'infection virale et qu'ils régulent négativement l'expression des gènes anti-viraux IFNB1, IFIT1 et TNF.

Les ligands WNT2B et WNT9B activent la voie canonique qui converge vers l'implication de la CTNNB1 [571-575]. Ainsi, afin de mieux identifier des faux positifs du criblage primaire qui

devraient inclure des composants clé de la signalisation WNT/CTNNB1, nous avons réalisé un mini-criblage aux shARNs pour évaluer l'effet du silençage des gènes annotés de la signalisation WNT, sur la transcription d'IFNB1 en réponse au VS. Notre criblage a spécifiquement confirmé l'effet de WNT2B et WNT9B et a rajouté la CTNNB1 comme un régulateur négatif de la transcription d'IFNB1(non-montré). De plus, nous avons démontré que l'incubation des cellules infectées avec la protéine purifiée WNT9B réduit la transcription d'IFNB1, d'IFIT1. À l'inverse, WNT3A induit une activation importante de la transcription TCF/LEF sans pour autant affecter la transcription d'IFNB1et d'IFIT1 en réponse à l'infection par le VS. Ces résultats indiquent que la stabilisation de la CTNNB1 n'a pas systématiquement le même effet immuno-régulateur, et requière plutôt l'implication de ligands spécifiques.

Par la suite, nos travaux ont établi un rôle important de la CTNNB1 dans la modulation négative de la production d'IFNB1, d'ISGs et de TNF α suite à l'infection par des virus à ARN comme le VS et le VHC, dans des cellules épithéliales et immunes. Mécanistiquement, nos résultats préliminaires démontrent que les niveaux protéiques de la CTNNB1 augmentent rapidement lors de l'infection par le VS supposant une stabilisation de la protéine. De plus, nous avons observé que l'infection virale induit la translocation nucléaire de la CTNNB1et une co-localisation avec IRF3 et la sous-unité p65 de NF- κ B. Nous avons également démontré que la CTNNB1 interagit avec ces deux facteurs de transcription. Toutes ces données supportent l'hypothèse que l'infection virale induit un nouveau réseau d'interactions protéiques autour de la CTNNB1 qui permet de diriger son activité vers la régulation négative de la transcription des

gènes de la réponse immunitaire innée tels que l'IFNB1, ISGs et gènes dépendant de NF-κB (cytokine, TNFα etc).

Ainsi, nous avons enchainé nos travaux par l'étude de l'interactome de la CTNNB1 dans des cellules infectées par le VS et ensuite, d'évaluer l'effet fonctionnel des partenaires identifiés sur la régulation de la transcription d'IFNB1 et de TCF-LEF. Cette approche a permis l'identification de nouveaux partenaires de la CTNNB1 agissant comme des régulateurs négatifs de la transcription d'IFNB1, sans toutefois affecter la voie de signalisation canonique WNT3A/CTNNB1 qui est TCF-LEF dépendante.

Dans cette catégorie, NKRF est l'interactant de la CTNNB1 priorisé pour la caractérisation subséquente de son rôle dans la régulation négative de l'immunité antivirale, en collaboration avec la CTNNB1. La rationalité de ce choix réside dans le fait que NKRF est caractérisé comme un répresseur de la transcription d'IFNB1 et d'autres gènes régulés par NF-κB [135] [515, 524].

L'étude de l'interactome de la CTNNB1 a également permis l'identification du partenaire DDB1, régulant les deux voies d'IFNB1 et TCF-LEF. Ainsi, en stimulant par WNT3A, DDB1 est caractérisé comme un régulateur négatif de la stabilité de la CTNNB1, et son action est localisée en amont du complexe de destruction. Curieusement, nos données indiquent que suite à l'infection par le VS, DDB1 se dissocie de la CTNNB1 ce qui promouvoit sa stabilisation et ainsi la régulation négative de la transcription d'IFNB1.

Dans le présent chapitre, nous discuterons les principaux résultats obtenus dans les chapitres 2, 3 et 4 ainsi que l'apport de ces découvertes à notre compréhension du rôle de la CTNNB1 et ces régulateurs dans la réponse antivirale.

V.2 La sécrétion de ligands WNT spécifiques régule l'immunité antivirale innée

Notre étude décrit les ligands WNT2B et WNT9B comme des régulateurs de la réponse immunitaire innée. Ces deux WNTs sont principalement connus pour leurs rôles dans le développement et la fonction de plusieurs organes, notamment les reins, le cœur et le foie [576-579]. Toutefois, des rapports récents illustrent des liens importants entre WNT2B et la régulation des réponses immunitaires [580-582]. Ainsi, dans les cellules hépatiques, WNT2B régule négativement la signalisation en aval de TLR4, notamment celles de NF- κ B et MAPK suite à son induction par le LPS [580]. De ce fait, WNT2B est caractérisé comme un suppresseur endogène de la signalisation TLR4, qui est associée aux maladies inflammatoires du foie telles que la fibrose [580].

Toujours dans le cadre de la régulation négative des processus de l'immunité innée, l'augmentation de l'expression/sécrétion d'autres ligands WNTs ou des récepteurs FZDs a été décrite dans le cadre des infections bactériennes. Ainsi, une série de rapports a associé la diminution de l'expression de l'IL8 avec l'augmentation d'expression de FZD 2,7, 8, de WNT 11 et 2 et de la stabilisation de la CTNNB1 dans les cellules épithéliales de colon infectées avec *S.typhimurium* [392, 393]. L'infection par *M. tuberculosis* implique plutôt l'augmentation d'expression de WNT6 [583], FZD4 et WNT5A [584] WNT3A et FZD1 [395] et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme TNF au niveau des macrophages.

Toutes ces données convergent vers un rôle physiologique important des ligands WNTs dans la régulation des processus de l'immunité innée. Toutefois, la cinétique d'expression/sécrétion de WNTs particuliers devrait largement dépendre du type du pathogène et du type cellulaire.

D'autre part, ça sera intéressant en premier lieu de mieux élucider les mécanismes moléculaires qui régulent l'expression/sécrétion de WNTs et de FZDs spécifiques en réponse à une stimulation virale. Une régulation croisée entre l'activation des PRRs et l'expression des ligands WNTs devrait exister. Notamment, il a été préalablement démontré que les voies NF- κ B et MAPK, résultant de l'activation de TLR peuvent directement réguler l'expression du ligand WNT5A afin de réguler des processus inflammatoires [585, 586]. Ainsi, l'exploration mécanistique de cet aspect dans le cadre des infections virales pourrait limiter et spécifier les ligands WNTs qui seront impliqués, dans un type cellulaire particulier, lors d'une réponse physiologique à l'induction virale.

V.3 La CTNNB1 est un régulateur négatif de l'immunité antivirale innée

Étant l'effecteur principal de la voie WNT canonique, nos travaux ont confirmé l'implication de la CTNNB1 dans la régulation négative de l'immunité antivirale. Ainsi, le silençage de la CTNNB1 dans des cellules infectées augmente significativement l'expression d'IFNB1, des gènes induits par les IFNs de type I et de gènes pro-inflammatoires dépendants de NF- κ B. À l'inverse, la surexpression de la CTNNB1 ou sa stabilisation par l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de GSK3 inhibent l'induction de ces effecteurs antiviraux. L'effet de la déplétion de la CTNNB1 sur l'augmentation de l'immunité antivirale a été démontré suite à l'infection des hépatocytes primaires par le VS et VHC, plus intéressant cet effet corrèle avec une diminution de la réplication du VHC.

Nous décrivons la première observation d'un rétrocontrôle de la voie RLR par la voie WNT/CTNNB1 suite à une infection virale. Ce phénotype de boucle de rétro-contrôle négatif par

WNT/CTNNB1 est toutefois observé dans la suppression de la réponse inflammatoire de TLR dans les cellules épithéliales alvéolaires infectées par *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) ou par LPS [587], dans les cellules intestinales infectées par *S.typhimurium* [392, 393] et dans les macrophages infectées par *M. tuberculosis* [395]. De plus, le rôle anti-inflammatoire de la CTNNB1 a été démontré *in vivo* chez des souris, où la CTNNB1 fournit un rétro-contrôle négatif de la régulation de TLR4 afin d'inhiber l'activité de NF- κ B/IRF3 et, finalement, de supprimer les gènes pro-inflammatoires [442]. Ces données suggèrent que le rétrocontrôle exercé par la voie WNT/CTNNB1 constitue une réponse physiologique intrinsèque à la cellule afin de moduler la réponse inflammatoire.

V.3.1 Les mécanismes potentiels de la régulation de l'immunité antivirale par la CTNNB1

V.3.1.1 L'inactivation de l'activité de GSK3 lors de l'infection virale

Nos résultats ont montré que l'inhibition de GSK3 induit une réduction drastique de la réponse antivirale d'une façon dépendante de la stabilisation de la CTNNB1. Conformément à cela, plusieurs rapports ont démontré que des inhibiteurs de GSK3 entraînent des effets anti-inflammatoires puissants dans diverses maladies en modulant la production des cytokines inflammatoires. Ainsi, les inhibiteurs de GSK3 réduisent l'expression de l'IL-6 induite par le LPS dans le modèle murin du choc septique et dans les cellules gliales primaires en culture [588]. Ils soulagent le trouble bipolaire en réduisant la sécrétion de TNF- α et d'autres cytokines [589]. Ils favorisent également la résistance de l'hôte contre l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* et à PRRSV (qui profitent de l'activation de NF- κ B) en réduisant la sécrétion des cytokines pro-

inflammatoires [441, 590]. Plus intéressant, plusieurs de ces études indiquent que la stabilisation de la CTNNB1 induite par l'inhibition de GSK3 est à l'origine de la régulation négative des cytokines pro-inflammatoires [326, 328, 329, 440, 441]. De plus, dans diverses études *in vivo*, il a été démontré que l'activation de la signalisation WNT/CTNNB1 par l'utilisation des inhibiteurs de GSK3 inhibe fortement les réponses pro-inflammatoires et protège ainsi les animaux des conditions physiopathologiques [398, 591-593].

Les effets anti-inflammatoires drastiques qu'on observe avec les inhibiteurs de GSK3 suggèrent que la stabilisation de la CTNNB1 durant l'infection virale résultera en partie de l'inactivation de GSK3. Mécanistiquement, cette inactivation peut être le résultat cumulatif de plusieurs événements moléculaires comme: i- La sécrétion de WNT2B et WNT9B, car l'activation de la voie WNT canonique peut entraîner l'inhibition de l'activité de GSK3 β via son interaction avec les co-récepteurs LRP5/6 [294, 295]. ii- L'activation des voies PI3K/AKT ou MAPK qui induisent l'inactivation de GSK3 par la phosphorylation de résidus sérines (Ser21 pour GSK3 α et Ser9 pour GSK3 β) [594]. Il se trouve que de multiples signaux extracellulaires induisent une phospho-inactivation rapide de GSK3 [595], entraînant une diminution spectaculaire de son activité enzymatique. Or, il a été démontré que l'induction des PRRs par des bactéries et des virus active la voie PI3K/AKT qui inactive GSK3 [326, 398, 596-599]. En appui à nos résultats, l'infection par plusieurs virus conduit également à la stabilisation de la CTNNB1 en induisant l'inactivation de GSK3 β [409-414] [405-407, 426].

De plus il est bien décrit que l'inactivation de GSK3 induite par les stimuli bactériens régule négativement la production des cytokines pro-inflammatoires [398, 595]. Ainsi, il sera pertinent d'analyser l'état d'activation de GSK3 durant une cinétique d'infection virale.

V.3.1.2 L'interaction entre la CTNNB1 et NF- κ B :

Nos travaux démontrent que la CTNNB1 régule négativement la transcription de plusieurs gènes dépendant de NF- κ B comme l'IFNB1 et TNF. De plus, nous avons validé l'existence d'une forte interaction constitutive entre la CTNNB1 et la sous-unité p65 de NF- κ B supportant qu'il y a une collaboration physiologique entre les deux protéines dans la régulation de la réponse antivirale.

Or, dans la littérature, il est communément admis que la CTNNB1, dans différents contextes cellulaires, régule négativement la production des cytokines pro-inflammatoires en ayant principalement un rôle inhibiteur sur la cascade de signalisation de NF- κ B [321]. La CTNNB1 peut physiquement interagir avec p65 [322, 324, 326] et p50 [322, 323, 325, 326, 600] dans différents types cellulaires, entraînant une réduction de l'activité de transactivation de l'expression des gènes cibles des facteurs NF- κ B comme IL-1 β ou TNF- α . Un des mécanismes proposés est que la CTNNB1 affecte la phosphorylation de I κ B- α et retient NF- κ B au niveau du cytoplasme [325, 326] [327, 328], Un second est que l'association avec la CTNNB1 réduit directement la liaison des facteurs NF- κ B sur l'ADN [322] [324]. Ainsi, l'effet de la CTNNB1 en tant que régulateur négatif de l'immunité antivirale peut s'expliquer par la régulation négative observée sur la voie de signalisation NF- κ B (**Article 1, Figures 3–6, S10 and S11**). Dans nos travaux, on observe que la stabilisation de la CTNNB1 suite à une cinétique d'infection avec le VS corrèle avec la réduction de la phosphorylation d'I κ B- α , et à l'inverse, la déplétion de la

CTNNB1 augmente sa phosphorylation et active la voie NF- κ B (**Article 1, Figure 4A, 5D**). De plus, le silençage de la CTNNB1 dans les cellules infectées par le VS augmente les niveaux d'ARNm de TNF α confirmant l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (**Figure 3F, 4D, 6B**), ces résultats indiquent que le silençage de la CTNNB1 affecte la phosphorylation d'I κ B- α . De plus, l'interaction constitutive observée entre la CTNNB1 et NF- κ B p65 (**Figure 7, S12B**) pourrait aussi être compatible avec un mode d'action de rétention de NF- κ B dans le cytoplasme par la CTNNB1 suite à l'infection par le VS. Toutefois, nous avons observé la translocation nucléaire de la CTNNB1 ainsi qu'une co-localisation avec p65 en réponse à l'infection par le VS (**Article 1, Figure 4E, S9**). Ces résultats suggèrent que la CTNNB1 et p65 peuvent également interagir au niveau nucléaire afin de réprimer la transcription des promoteurs p65-dépendant. En plus, comparé au blocage de la translocation nucléaire de NF- κ B, qui pourrait influencer tous les gènes cibles, l'effet régulateur de la CTNNB1 sur NF- κ B p65 au niveau nucléaire sur des gènes sélectionnés comme l'enhancéosome d'IFNB1 fournira un contrôle plus élaboré et spécifique.

V.3.1.3 L'interaction CTNNB1-IRF3 :

Nos observations impliquent également une régulation médiée par la CTNNB1 qui se produit au niveau d'IRF3, et qui réprime la transcription IRF3/p65-dépendante d'IFNB1 mais également celle d'IFIT1 qui possède deux ISRE, permettant une induction par la liaison d'IRF3 uniquement [200]. Nos observations ont démontré qu'IRF3 peut interagir avec la CTNNB1 d'une façon dépendante de l'infection au VS (**Article 1, Figures 7, S12**). De plus, le rôle négatif de la CTNNB1 dans la transcription d'IFNB1 et d'ISGs dans les cellules du CCR propose également

une interaction de la CTNNB1 avec IRF3 qui bloque sa translocation nucléaire suite à l'infection par VSV et VS [397]. Toutefois, contrairement à l'interaction de la CTNNB1 avec les facteurs NF- κ B qui est documentée dans différents contextes physiologiques [321], celle avec IRF3 est controversée dans le contexte de l'infection virale [123, 330, 331]. En effet, des fonctions opposées de la CTNNB1 sont proposées lors de la régulation de l'IFNB1. La CTNNB1 agit comme un co-activateur d'IRF3 dans la transcription d'IFNB1 suite à l'infection par *Listeria monocytogenes* et par VSV dans les macrophages de souris [123]. Cette action requiert le senseur d'acides nucléiques LRRFIP1, permet le recrutement des acétyltransférases CBP/p300 au niveau de l'enhancéosome et l'induction de la transcription d'IFNB1 par un mécanisme qui est indépendant de la voie RLR et de MAVS. La phosphorylation de la CTNNB1 au niveau de la Ser552 par AKT est également requise en aval de l'activation de TLR3 et possiblement cGAS-STING pour une induction optimale d'IFNB1 dans des macrophages de souris [123, 375].

La question qui s'impose est la raison de la divergence des résultats sur la régulation d'IRF3 par la CTNNB1. En effet, ce qui paraît évident est l'importance du contexte cellulaire, souris vs humain et possiblement les MPTs de la CTNNB1 qui seront impliquées dans la régulation de l'immunité antivirale. Ces MPTs peuvent en effet dépendre du type cellulaire et de pathogènes qui activent des PRRs différents ainsi que d'autres voies de signalisation interférant avec et modulant la signalisation des PRRs. Ce qui pourrait amener à une régulation contexte-dépendante.

Dans notre étude, nous avons associé la régulation négative de la voie RLR par la CTNNB1 à la sécrétion de ligands WNT2B et WNT9B, supposant que l'infection par le VS entraîne la

stabilisation d'un pool spécifique de la CTNNB1 qui réside au niveau du CD. La phosphorylation de la CTNNB1 par AKT au niveau de Ser552 n'est pas impliquée car notre cinétique d'infection avec le VS indique une stabilisation de la CTNNB1 qui ne corrèle pas avec une induction de la phosphorylation au niveau Ser552 (**Article 1 Figure 4A**). De plus, cette MPT est associée au pool membranaire de la CTNNB1 qui affaiblit son ancrage au niveau des jonctions d'adhérence [342]. Ainsi, le rôle de la CTNNB1 dans la régulation négative IRF3-dépendante de la production des IFNs de type I et d'ISGs médiée par les différents PRRs et dans différents contextes cellulaires mérite une plus profonde investigation ; des MPTs impliquées et surtout des pools cellulaires de la CTNNB1 qui seront ciblés lors de l'induction virale.

De plus, nous avons associé le rôle de co-répresseur à une augmentation des niveaux de la CTNNB1 active qui est déphosphorylée dans les positions Ser33/Ser37/Thr41. Conformément à nos données, le récent modèle proposé par l'équipe du Dr Servant démontre que l'inhibition de GSK3 α/β résulte en la déphosphorylation de la CTNNB1 et ainsi la diminution du recrutement d'IRF3 sur le promoteur d'ISG56 [331]. À l'inverse, l'étude propose également que la phosphorylation de la CTNNB1 par GSK3 α/β au niveau des Ser33/Ser37/Thr41 pendant l'infection virale entraîne le recrutement de la CTNNB1 au niveau d'IRF3 où elle agit comme un co-activateur de la liaison d'IRF3 à l'ADN. Ces observations indiquent que la CTNNB1 peut alterner entre les deux fonctions de répression et d'activation d'une façon qui dépendrait de l'activité kinase de GSK3. Toutefois nous proposons la prédominance de la fonction répressive étant donné que nos données indiquent clairement que l'infection avec le VS augmente progressivement la fraction non-phosphorylée de la CTNNB1 (**Chapitre II, Figure II.4A**),

supportant que l'infection virale entraîne l'inactivation de la dégradation de la CTNNB1 médiée par GSK3.

Ainsi, avec l'ensemble des données nous proposons que l'activation virale de la voie RLR conduit à l'inactivation de GSK3 et à l'augmentation de la fraction non-phosphorylée de la CTNNB1 (active), qui interagit avec p65 et IRF3 de façon à terminer la production d'IFN β , de gènes cibles de NF- κ B et d'ISGs. Mécanistiquement, la CTNNB1 pourrait réguler négativement les fonctions nucléaires de p65 et d'IRF3 sur l'enhancéosome ou sur les promoteurs de gènes cibles spécifiques de façon TCF-LEF indépendante en priorisant les stratégies suivantes (**Figure V.1**) :

- i- Soit réduit leur recrutement sur la chromatine, une bonne piste à explorer dans ce sens serait de vérifier si la CTNNB1 en s'associant avec p65 ou IRF3 empêche leur association avec des co-activateurs transcriptionnels, notamment CBP/p300. Ce mécanisme d'action est suggéré dans des études antérieures illustrant l'effet négatif de la CTNNB1 sur la transcription de NF- κ B dans des contextes différents de l'infection virale [332, 601].
- ii- Soit la CTNNB1 recrute des répresseurs transcriptionnels au niveau des sites de liaison de p65 et d'IRF3. Ces répresseurs peuvent par exemple induire des modifications épigénétiques qui inactivent la transcription comme des HDACs.

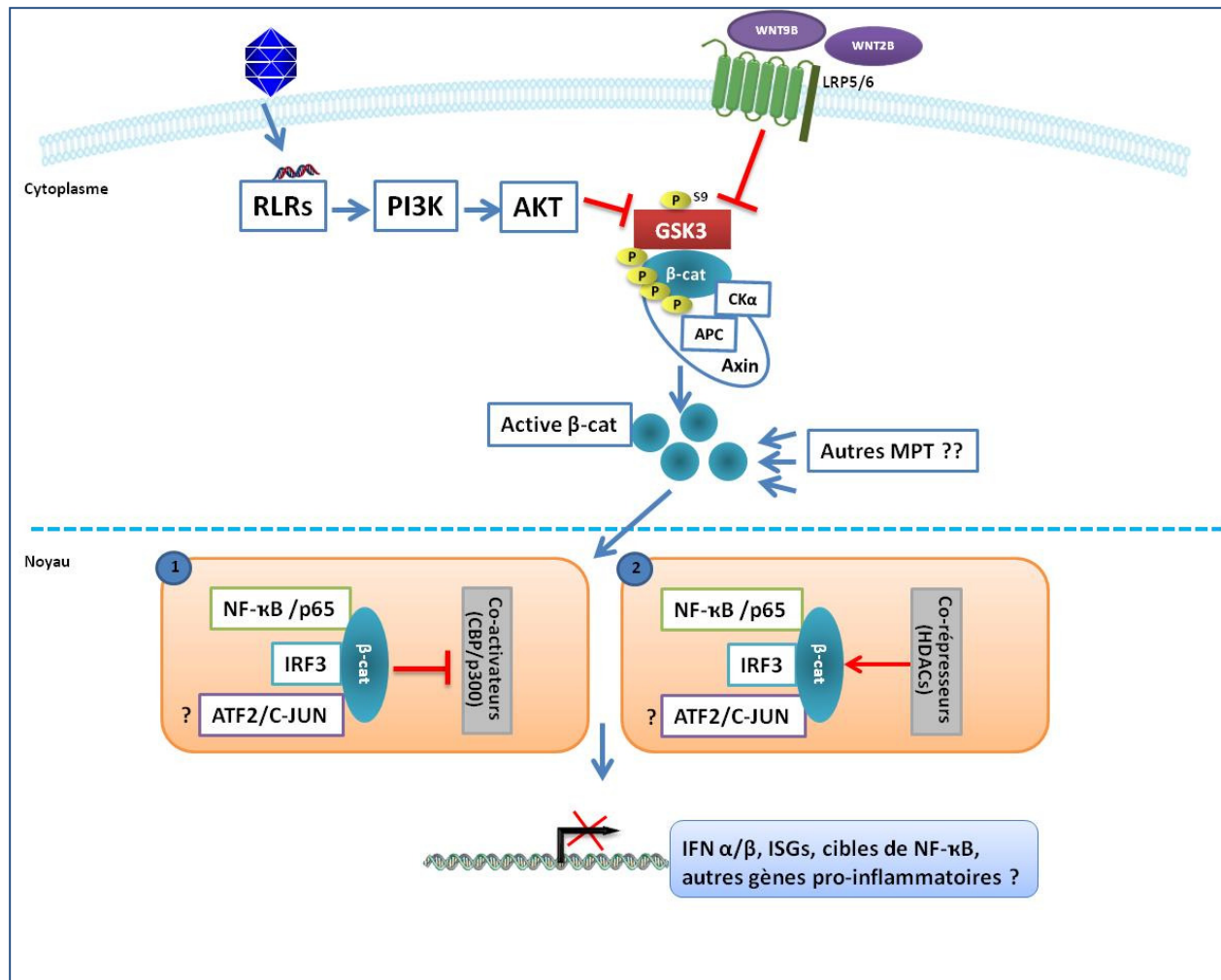


Figure V.1 : Modèle des mécanismes potentiels de la régulation de l'immunité anti-virale par la CTNNB1. L'activation virale des récepteurs RLR entraîne la sécrétion de ligands WNT spécifiques et l'activation d'autres voies de signalisation comme PI3K/AKT. Il en résulte l'inactivation de GSK3 et ainsi la stabilisation de la CTNNB1. La CTNNB1 active (qui pourrait recevoir d'autres MPTs) est transloquée dans le noyau pour interagir avec les facteurs de transcription NF-κB/p65, IRF3 et possiblement ATF2/C-JUN afin de terminer leur activité transcriptionnelle selon deux modes d'action : 1- Soit en empêchant leur association avec des co-activateurs transcriptionnels, notamment CBP/p300. 2- Soit en recrutant des co-répresseurs transcriptionnels au niveau de leurs sites de liaison comme les répresseurs épigénétiques HDACs

V.1.2.4 Autres aspects mécanistiques à investiguer

V.1.2.4.1 Les MPTs de la CTNNB1 associées à la régulation négative de l'immunité antivirale

Nos travaux nous dirigent vers l'identification des MPTs de la CTNNB1 associée à son effet de co-répresseur transcriptionnel d'IFNB1 et de gènes pro-inflammatoires. L'acétylation de la CTNNB1, qui peut être réversible, est une bonne cible à explorer puisqu'elle est liée à la suppression de son activité transcriptionnelle dans les cellules du CCR [383], les cellules du cancer pancréatique [602] et les cellules hépatiques infectées avec du VHB [419]. Il sera donc très pertinent dans un premier temps d'analyser l'état d'acétylation de la CTNNB1 lors d'une cinétique d'infection virale en utilisant les anticorps spécifiques. Plus précisément, il sera pertinent d'évaluer si l'acétylation de la CTNNB1 au niveau de K49 est réversible lors d'infections virales, [382]. la déacétylation de la CTNNB1 par HDAC6 au niveau de K49 est liée à son action de co-activateur de la transcription dépendante d'IRF3 [330]. Il serait intéressant de déterminer si l'acétylation au niveau de K49 procure à la CTNNB1 une fonction répressive par une régulation des sites de phosphorylation de la CTNNB1 par CK1 α (Ser45) et GSK3 (Ser33/Ser37/Thr41). En effet, il a été suggéré dans les cellules progénitrices neurales humaines que l'acétylation de K49 empêche GSK3 de phosphoryler ses sites cibles [603]. Comme on propose un rôle important de l'inactivation de la phosphorylation médiée par GSK3 de la CTNNB1, dans la régulation négative de l'immunité antivirale, il sera intéressant d'explorer conjointement l'acétylation et la phosphorylation de la CTNNB1 dans une cinétique d'infection

par des virus à ARN dans des cellules épithéliales et immunes (notamment les cellules dendritiques et les macrophages). De même, il sera intéressant de vérifier la dynamique d'interaction des facteurs de transcription IRF3 NF- κ B et C-JUN avec ces formes de la CTNNB1 via des essais de co-immunoprécipitation.

V.1.2.5 Une approche à large spectre pour élucider le rôle immuno-modulateur de la CTNNB1

Nous avons utilisé l'IFNB1 comme un gène représentatif de l'immunité antivirale intrinsèque à la cellule infectée suite à son induction dans tous les types cellulaires et son rôle majeur dans l'éradication de l'infection. Toutefois, la CTNNB1 peut réguler l'expression de plusieurs cytokines antivirales, proinflammatoires et anti-inflammatoires. Ainsi, une analyse à l'échelle génomique par des techniques de ChIP-seq dans des cellules épithéliales et immunes (souches ou pluripotentes iPSC) permettra d'identifier les sites de liaison de la CTNNB1 sur l'ensemble de la chromatine. La corrélation des locus enrichis avec les sites de liaison consensus des facteurs de transcription indiquera éventuellement les partenaires avec lesquels la CTNNB1 coopèrent pour mener à la répression transcriptionnelle suite à l'infection virale. De plus, l'analyse combinée des résultats du ChIP-Seq avec ceux qu'on peut obtenir par la technique des puces à ADN ou d'ARN-Seq dans des cellules déplétées ou non de la CTNNB1, permettra d'identifier les gènes cibles qui sont directement et fonctionnellement régulés par la CTNNB1 lors d'une infection virale. Ce type d'analyse intégrale a été utilisée dans les cellules de cancer de colon afin d'identifier les gènes cibles régulés directement par la CTNNB1 [604]. Ces études devraient identifier l'ensemble des gènes de l'immunité qui sont ciblés par la CTNNB1 et qui profilent un

phénotype négatif lors d'une infection virale. Les résultats obtenus peuvent avoir aussi des retombées bénéfiques sur la compréhension d'autres maladies inflammatoires qui sont affectées par la dérégulation de la signalisation WNT/CTNNB1.

V.2 La spectrométrie de masse

Plusieurs questions demeurent non-résolues quant aux mécanismes moléculaires de la fonction immunorégulatrice de la CTNNB1. Selon nos données, l'infection virale conduit à la stabilisation d'un pool de la CTNNB1 spécifique à la régulation de l'immunité antivirale et indépendamment de TCF-LEF. Cette activité ne sera possible que suite à la formation d'un nouveau réseau d'interactions conduisant à des complexes protéiques répresseurs dépendant de la présence de la CTNNB1 et contribuant à la terminaison de la transcription médiée par IRF3 et/ou p65. Notre analyse protéomique a permis d'identifier des partenaires de la CTNNB1 dont l'interaction est modulable par l'infection au VS. Ainsi nous avons identifié 30 protéines dont 24 sont de nouveaux partenaires de la CTNNB1 qui devraient réguler ses fonctions suite à la stimulation virale. La caractérisation fonctionnelle des partenaires identifiés sur la transcription d'IFNB1 et TCF-LEF a permis leur classement dans trois groupes fonctionnels; soit NKRF, ZAP et DDX6 qui régulent spécifiquement l'expression d'IFNB1; HDAC1, HDAC2 et DDB1 qui régulent similairement l'expression d'IFNB1 et TCF-LEF et inversement pour les partenaires SF3B4 et UGGT1. Ainsi, notre étude a confirmé i- l'existence d'un réseau protéique spécifique impliquant la CTNNB1 dans la régulation ultime de l'immunité innée .ii- L'existence

d'une collaboration physiologique entre la voie RLR et la voie canonique WNT/CTNNB1 suite à l'infection virale.

V.2.1 Découverte d'un nouveau complexe E3 ligase régulant la stabilité de la CTNNB1

Les niveaux cytosoliques de la CTNNB1 sont constamment régulés par le système ubiquitine-protéasome [343], et plusieurs E3 ligases peuvent cibler la CTNNB1 d'une façon contexte dépendante [344-350]. Le partenaire DDB1 est un composant majeur des E3 ubiquitin ligases CUL4A et B [605]. Selon notre analyse MS-MS, DDB1 est identifié comme un partenaire de la CTNNB1 dont l'interaction est réduite en réponse à l'infection par le VS. Nous avons validé l'interaction endogène entre DDB1 et la CTNNB1 dans différentes lignées cellulaires épithéliales et cellules du CCR tout en confirmant la diminution de cette interaction suite à l'infection par le VS. De plus, selon notre analyse fonctionnelle DDB1 est caractérisé comme un régulateur négatif de la transcription d'IFNB1. Nos résultats démontrent que DDB1 contribue à une stabilisation de la CTNNB1 dans le contexte de l'infection virale qui corrèle avec l'inhibition de la transcription d'IFNB1, offrant ainsi un mécanisme post-transcriptionnel de la régulation négative de la réponse antivirale IFN par la CTNNB1. En effet, nos expériences mécanistiques préliminaires indiquent que l'ubiquitination de la CTNNB1, qui normalement conduit à sa dégradation par le protéasome, est inhibée suite à l'infection par le VS tandis que le silençage de DDB1 restaure cet effet. Parallèlement, nous avons déterminé que l'interaction entre DDB1 et la CTNNB1 est également réduite suite à l'activation de la voie de signalisation de la CTNNB1 par WNT3A et par l'inhibiteur de GSK3. Sur le plan fonctionnel, DDB1 agit comme un régulateur négatif de l'activité transcriptionnelle TCF-LEF-dépendante de la CTNNB1 en

amont ou au niveau du CD. Nos données préliminaires suggèrent que DDB1 coopère avec le système CUL4 afin d'induire l'ubiquitination de la CTNNB1 et de réduire sa demi-vie suite à la stimulation par WNT3A d'une façon dépendante de l'activité kinase de GSK3.

Ces données ont permis de distinguer des modes d'action différents de DDB1 dans la régulation de la stabilité de la CTNNB1 selon le modèle suivant (**Chapitre IV. Figure IV.8**): Dans les cellules normales non-stimulées, DDB1 est associé à la CTNNB1 et contribue à son ubiquitination et à sa dégradation (probablement en parallèle avec le système canonique de dégradation). Lors de la stimulation WNT, DDB1 est dissocié de la forme stabilisée de CTNNB1 qui est transloquée au noyau pour assurer son rôle de co-activateur de la transcription dépendante des facteurs TCF/LEF. Toutefois, DDB1 reste associé à un pool de la CTNNB1 et continue à réguler sa stabilité. Ce pool pourrait être la forme phosphorylée de la CTNNB1 qui n'est plus accessible pour β -TrCP au niveau du CD. Suite à la stimulation par le VS, DDB1 est d'abord dissocié de la CTNNB1, possiblement à cause de l'inactivation de GSK3, il en résulte ensuite sa protection contre la dégradation causée par le CD. Les deux événements conduisent à la stabilisation d'un pool spécifique de CTNNB1 qui régule négativement la transcription d'IFNB1.

Un mécanisme potentiel de cette régulation est que le système CUL4-DDB1 dégrade un membre du CD permettant de stabiliser la CTNNB1. Dans ce sens, CK1 α serait un bon candidat car il a été démontré que CK1 α peut être ciblée pour la dégradation via le système CUL4-DDB1 suite à l'utilisation des molécules immunomodulatrices dérivant chimiquement de la molécule de thalidomide (ImiDs) [569, 606]. Ces différents **ImiDs** se lient au récepteur du substrat de la

machinerie E3 ligase CUL4-DDB1 et reprogramment le système CUL4-DDB1 pour qu'il cible de nouvelles protéines pour la dégradation telles que CK1 α [569, 606]. Ces données supportent l'hypothèse que l'infection virale peut mimer l'action des ImiDs en redirigeant le système CUL4-DDB1 vers la dégradation de CK α et entraînant ainsi la stabilisation de la CTNNB1. Dans un tel scénario, il sera pertinent d'étudier les éléments suivants lors d'infection par plusieurs virus : 1-Valider l'interaction de DDB1 avec CK1 α et éventuellement avec les autres protéines du CD. 2-Étudier la stabilité protéique de CK1 α par des essais de demi-vie en déplétant ou surexprimant DDB1 3- Confirmer par des essais d'ubiquitination *in vivo* que CUL4-DDB1 est responsable de l'ubiquitination de CK1 α tout en corrélant l'inhibition DDB1-dépendante de l'ubiquitination de la CTNNB1 lors de l'infection virale.

Il existe une seconde possibilité selon laquelle l'infection virale entraîne une compétition entre le système CUL4-DDB1 et CUL1-SKP1 sur β -TrCp, réduisant indirectement la dégradation de la CTNNB1. En effet, β -TrCp fait partie des protéines DCAFs qui constituent le récepteur du substrat -à dégrader- par la machinerie CUL4-DDB1 [607]. Plus intéressant encore, il a été démontré que CUL4A-DDB1 peut s'associer avec β -TrCp pour dégrader le régulateur du stress hypoxique REDD1 suite à sa phosphorylation par GSK3 β [608]. Ainsi, il est judicieux de spéculer que le système CUL4-DDB1 lors d'une infection virale, se dissocie de la CTNNB1 et interagit avec la β -TrCp pour stabiliser la CTNNB1. Afin de vérifier cette hypothèse, il sera important de valider l'interaction β -TrCp-DDB1, la modulation de cette interaction suite à l'infection virale et que la surexpression de DDB1 réduit l'association entre β -TrCp et la CTNNB1 de manière dose-dépendante.

V.2.1.2 Les mécanismes moléculaires de la régulation de la stabilité de la CTNNB1 par le système CUL4-DDB1

Nous avons validé l'interaction entre CUL4A et la CTNNB1 et avons observé que la surexpression de CUL4A ubiquitine la CTNNB1 (**Chapitre IV, Figure IV.S7**). Des essais supplémentaires d'interaction, de demi-vie et d'ubiquitination *in vivo* sont requis pour confirmer CUL4A et évaluer sa spécificité ou une redondance avec CUL4B dans la régulation de CTNNB1 suite à l'activation de la voie canonique et lors de l'infection virale.

L'action de CUL4-DDB1 dans la régulation de la stabilité de la CTNNB1 pourrait être conférée à l'interaction de la machinerie avec des DCAFs particulières. Dans ce sens, notre spectrométrie de masse a identifié quatre potentiels DCAFs qui sont : WDR36, WDR26, WDR77 et SMU1 (**Annexe 2**) qui interagissent avec la CTNNB1. Il est intéressant de noter qu'un récent papier a décrit que WDR26 interagit avec l'AXIN, et constitue un régulateur négatif de la dégradation de la CTNNB1 [609]. Comme on propose que DDB1 agisse au niveau du CD, WDR26 est un candidat attrayant pour une subséquente caractérisation. Sur plus de 300 protéines contenant le domaine WD40 (caractérisant les DCAFs) codées par le génome humain, il y a près de 90 DCAFs qui pourraient lier l'adaptateur DDB1 et être incorporées dans CUL4 comme sous-unités de reconnaissance de substrat [607]. Un mini-criblage au shARNs ciblant uniquement ce groupe de protéines permettra de confirmer la ou les DCAFs impliquées distinctement dans le cadre de la cascade WNT3A et en réponse à des infections virales.

V.2.1.3 DDB1 et stabilisation de la CTNNB1 dans les cellules tumorales :

Similairement aux cellules infectées par le VS, nous avons observé une diminution drastique des quantités de la CTNNB1 suite au silençage de DDB1 dans les cellules de cancer de colon (DLD1, HCT116 et SW480), suggérant un rôle du système CUL4-DDB1 dans la stabilisation de la CTNNB1, qui contribue au développement tumoral (**Figure V.2**).

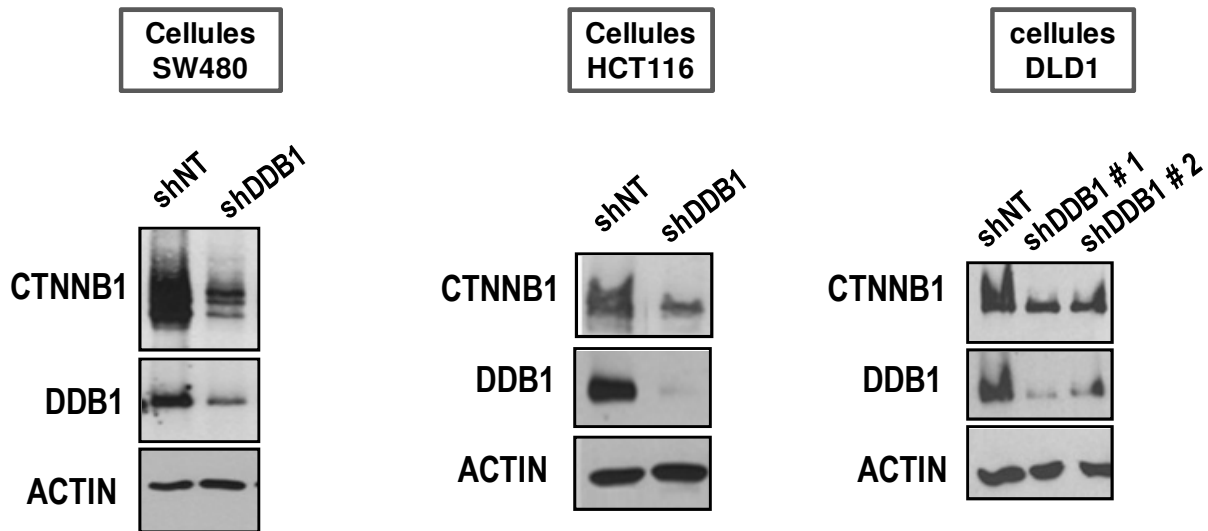


Figure V.2: DDB1 stabilise la CTNNB1 dans les cellules du CCRs. Le silençage de DDB1 dans les cellules SW480, HCT116 et DLD1 diminue significativement les niveaux protéiques de la CTNNB1.

En effet, la surexpression de CUL4A et CUL4B a été associée à plusieurs cancers et à une signalisation aberrante de la voie WNT/CTNNB1[610-613]. Des études cumulatives ont montré que CUL4A est anormalement exprimée dans le cancer du sein [610], le cancer de la prostate [611], le cancer de poumon non-à petites cellules [612] et plus récemment les CCRs [613]. La surexpression de CUL4A contribue à la progression des tumeurs, à la métastase et un taux de survie réduit pour les patients [614]. CUL4B est surexprimée dans le cancer du colon, et sa

surexpression est étroitement liée au stade de la tumeur, la différenciation histologique, l'invasion vasculaire et la métastase [615]. Mais contrairement à CUL4A, un lien entre CUL4B et la signalisation WNT/CTNNB1 est établi dans le cancer colorectal (CCR) et les CHCs [568] [567]. Une étude a montré que le silençage de CUL4B inhibe la prolifération des cellules provenant de CCR en inhibant la voie de signalisation WNT/CTNNB1 et en favorisant l'apoptose in vitro et in vivo [568]. Dans les CHCs, CUL4B est surexprimée dans les tissus et fonctionne comme un régulateur positif de la signalisation WNT/CTNNB1. De plus, le silençage de CUL4B entraîne la diminution des niveaux de la CTNNB1 [567]. Nos données avec DDB1 sur les cellules de cancers de colon sont conformes avec ces études (**Figure V.2**), mais il reste à confirmer si l'effet est associé à CUL4B. Des études futures seront requises pour l'élucidation des mécanismes moléculaires qui mènent à la progression des tumeurs suite à la surexpression de CUL4A/B d'une façon dépendante de DDB1 et de la signalisation WNT/CTNNB1. Un modèle est que l'expression aberrante de CUL4A/B d'une façon DDB1-dépendante (ou par activation aberrante de la voie WNT ou APC muté) réduit la stabilité de substrats qui sont impliqués dans la dégradation (régulation négative de la stabilité) de la CTNNB1 comme les composants du CD. Dans ce cas, les mécanismes de la stabilisation de la CTNNB1 suite à l'infection par le VS seront valables à évaluer dans les CCRs et les CHCs.

Mais la question qui se pose est pourquoi la cellule tumorale surexprimant la CTNNB1 profile un phénotype similaire à la cellule infectée par le virus lors du silençage de DDB1? C'est comme ci le comportement de la cellule du CCR et de la cellule infectée se croise à certains niveaux de la régulation de la CTNNB1. Un autre point commun est qu'en réponse au VS, les cellules

SW480 exprimant un fort niveau de la CTNNB1 (APC muté) démontre une très forte induction d'IFIT1 lors du silençage de la CTNNB1 (**Figure V. 3**).

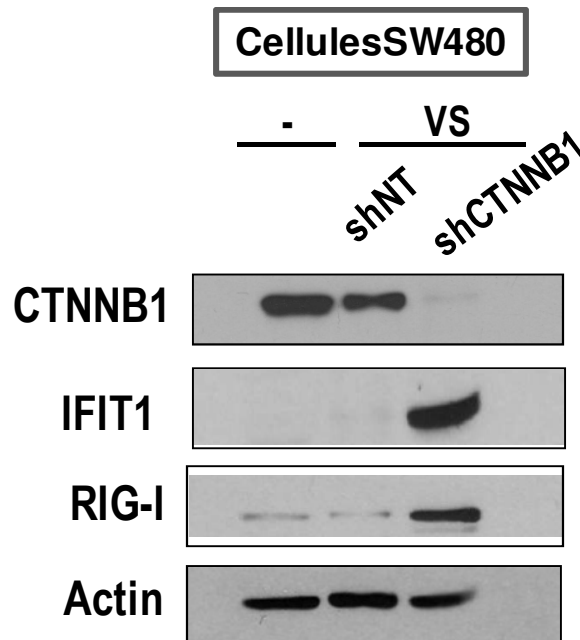


Figure V.3: la CTNNB1 régule négativement la réponse antivirale dans les CCRs. Le silençage de la CTNNB1 dans les cellules de SW480 augmente significativement les niveaux protéiques des ISGs IFIT1 et RIG-I en réponse à l'infection par le VS. (l'expérience a été réalisée par le membre du laboratoire Karl Guevin).

Ces données supportent que la CTNNB1 stabilisée d'une façon aberrante dans les CCRs régule négativement et fortement la cascade RLR induite par la détection d'ARN viral conduisant à la production d'IFNB1, offrant une rationnelle importante à la spécificité des virothérapies aux cellules cancéreuses. En effet, il est bien connu que les cellules tumorales peuvent échapper à la détection et destruction par le système de l'immunité adaptative grâce à de nombreuses stratégies, y compris la régulation négative du CMH et la sécrétion des molécules immunosuppressives

telles que PD-L1 [616]. Dans ce processus, l'évasion tumorale à l'immunité innée est une étape pré-requise, étant donné qu'elle représente la première arme de l'hôte dans la détection des DAMPs associés aux tumeurs. Reconnus par les PRRs, les antigènes tumoraux entraînent une production rapide des IFNs de type I et des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines vont amorcer et coopérer avec les réponses immunitaire adaptative afin d'éradiquer les cellules cancéreuses anormales. Ainsi, il devient de plus en plus clair que l'activation de la production des IFNs de type I joue un rôle critique dans l'élaboration spontanée d'une réponse immunitaire adaptative contre le cancer [617]. Conformément à nos données, la régulation négative de la production de l'IFN- β par la CTNNB1 suite à l'induction des RLRs a été récemment confirmée dans les cellules de CCRs suite la stimulation par le VS et VSV [397]. Ces observations supportent un rôle majeur de la CTNNB1 dans l'habilité des cancers à échapper à l'immunosurveillance. Ainsi, les partenaires et régulateurs de la fonction de la CTNNB1 dans la régulation négative de l'immunité innée identifiés dans nos travaux représentent des cibles immunomodulatrices potentielles pour la lutte contre les infections et le cancer.

V.2.2 Découverte d'un complexe répresseur NKRF- CTNNB1 au promoteur IFNB1

NKRF est décrit comme un répresseur transcriptionnel se liant à l'élément de régulation négatif (NRE) et spécifique à la suppression de l'activité basale des facteurs NF- κ B [135]. Ainsi, NKRF réprime la transcription basale des gènes IFNB1, IL-8, IP10 et hINOS [135] [515, 524]. NKRF inhibe également l'induction d'IP-10 et IL-8 par *Mycobacterium tuberculosis* dans les monocytes

[525], indiquant que son effet répresseur n'est pas limité à la transcription basale des gènes cibles.

Nous avons validé l'interaction entre NKRF et la CTNNB1 et avons démontré que, similairement à la CTNNB1, le silençage de NKRF augmente la transcription d'IFNB1 suite à l'infection par le VS. Aucun effet n'est observé sur le TOP-FLASH et sur le rapporteur EF1 α , confirmant que l'action de NKRF est spécifique à la régulation de la réponse anti-virale. De plus, le silençage combiné de NKRF et de la CTNNB1 n'affiche pas un effet additif sur l'augmentation transcriptionnelle d'IFNB1 suggérant que ces deux protéines fonctionnent par un même mécanisme. Notre fractionnement cellulaire démontre une localisation principalement nucléaire de NKRF, et une translocation nucléaire de la CTNNB1 suite à une cinétique d'infection au VS, ce qui suggère qu'un complexe NKRF-CTNNB1 régule la réponse antivirale au niveau nucléaire (**Figure V.4**).

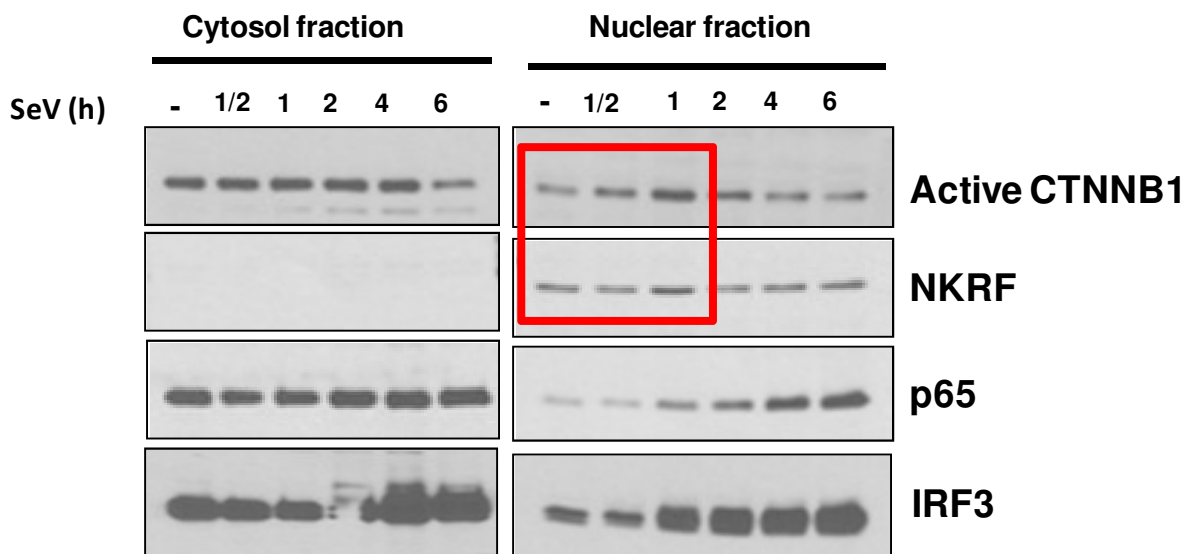


Figure V.4 : NKRF et la CTNNB1 interagiraient au niveau nucléaire. Expérience de fractionnement cellulaire sur des cellules A549 ayant subies une cinétique d'infection au VS. L'encadré montre la translocation nucléaire rapide de la CTNNB1 suite à l'induction virale et la localisation majoritairement nucléaire de NKRF.

Nous avons proposé que la CTNNB1 régule négativement la transcription d'IFNB1 via une interaction avec p65. Or p65 du facteur NF- κ B interagit directement avec NKRF [526]. De plus, il a été rapporté que la CTNNB1 module négativement la transcription de gènes qui se trouvent régulés également par NKRF (IL-8, hINOS) en réduisant l'activité transcriptionnelle de NF- κ B dans les cellules épithéliales intestinales colonisées par des bactéries [325, 326]. Ces données supportent un nouveau complexe protéique CTNNB1-NKRF qui se forme suite à l'infection virale afin de réguler négativement la transcription d'IFNB1 et d'autres gènes pro-inflammatoires en déplaçant p65 NF- κ B ou stabilisant un complexe répresseur NKRF-p65-CTNNB1 aux promoteurs.

V.2.2.1 Les mécanismes potentiels de la régulation négative d'IFNB1

V.2.2.1.1 Induction de modifications épigénétiques sur le promoteur d'IFNB1

La répression épigénétique du promoteur d'IFNB1 par le recrutement de HDAC est un mécanisme émergent dans la régulation négative de l'immunité innée [140, 521]. Il se peut alors que le complexe CTNNB1 s'associe avec des répresseurs épigénétiques pour inhiber la transcription d'IFNB1. Curieusement, nous avons identifié HDAC2 comme un partenaire qui s'associe avec la CTNNB1 suite l'infection par le VS. Nos résultats préliminaires ont confirmé

l'effet du silençage de HDAC2 sur l'augmentation de l'activité du rapporteur IFNB1. Également, l'effet inhibiteur de la stabilisation de la CTNNB1 par le BIO est partiellement restauré suite au silençage de HDAC2 (**Figure 5**), indiquant que HDAC2 ferait partie d'un complexe répresseur de la CTNNB1 suite à l'infection par le VS.

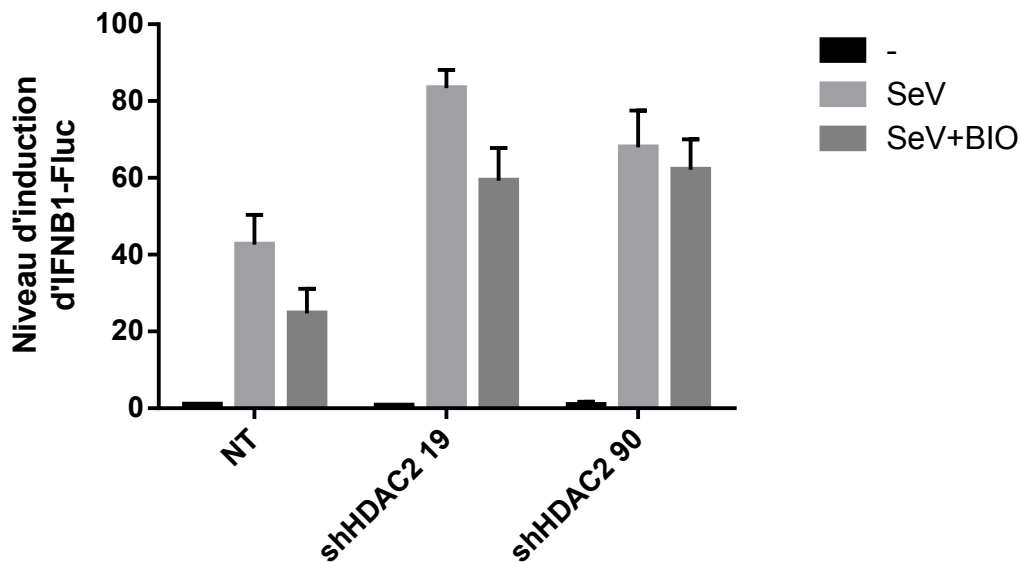


Figure V.5 : HDAC2 régule négativement la transcription d'IFNB1. Le silençage de HDAC2 augmente l'activité transcriptionnelle de l'IFNB1. L'effet inhibiteur de BIO sur l'induction du rapporteur IFNB1-Fluc est partiellement restauré dans les cellules déplétées de HDAC2.

Ainsi, ça sera important de valider par des essais de co-immunoprécipitation la formation de ce complexe CTNNB1-HDAC2 et de la présence de NKRF suite à l'infection virale. Le ChIP permettra de valider mécanistiquement la présence de ces protéines sur la chromatine ainsi que l'importance de NF- κ B p65 à médier son recrutement. Le ChIP permettra aussi de valider l'effet répresseur de HDAC2 à l'acétylation des histones H3/H4 au niveau du promoteur d'IFNB1.

V.2.2.1.2 Élongation de la transcription d'IFNB1

Outre le site de liaison à l'ADN, la protéine NKRF est composée de domaines fonctionnels distincts comprenant deux motifs de liaison à l'ARN et un domaine G-patch qui permet aussi des interactions avec de l'ARN et des hélicases [618]. Il a été rapporté que NKRF se lie sur le LTR de HIV-1 et interrompt l'élongation initiée des transcrits dans les cellules non-stimulées [619]. Ce mode de régulation transcriptionnelle est connu sous le nom de pause du promoteur proximal et se produit lors de la transcription de plusieurs gènes par l'ARN polymérase II (Pol II) [620]. De plus, des travaux récents ont démontré que NKRF interagit avec le facteur NELF (Negative Elongation Factor) et l'exonucléase XRN2 qui sont tous les deux impliqués dans la terminaison prématurée de l'élongation de la transcription médiée par la Pol II de plusieurs gènes [618, 621]. Nous avons également identifié ZNF326 comme partenaire de la CTNNB1 induit par l'infection au VS et qui régule négativement le promoteur IFNB1. Or ZNF326 est un régulateur de l'élongation des transcrits, faisant partie du complexe DBIRD qui interagit avec la Pol II [522]. Ces résultats supportent un complexe CTNNB1-NKRF-ZNF326 qui régule négativement la transcription médiée par NF- κ B durant l'élongation du transcript en influençant l'activité de Pol II. Ainsi, la CTNNB1 en interagissant avec p65 et NKRF, fera le lien entre les événements de régulation au niveau du promoteur et les événements de l'élongation en aval. Un mécanisme pareil est proposé pour la régulation négative de l'expression de A20 par NF- κ B et le régulateur négatif de l'élongation DSIF (DRB Sensitivity-Inducing Factor) [622]. Ainsi, il sera intéressant de confirmer si la CTNNB1 interagit avec d'autres facteurs négatifs d'élongation de la

transcription comme NELF et DSIF par immunoprécipitations des extraits nucléaires. Il sera également pertinent d'utiliser le ChIP-qPCR pour suivre le recrutement de Pol II sur différentes régions du gène d'IFNB1 suite à l'infection virale, dans les cellules déplétées de la CTNNB1, ZNF326 et NKRF. De plus, plusieurs anticorps sont disponibles qui reconnaissent différents états de phosphorylation du CTD de Pol II incluant la forme requise pour l'élongation précoce caractérisée par la phosphorylation au niveau Ser7/Ser5, et la forme qui permet l'élongation productive qui est phosphorylée au niveau de la Ser2 [623]. L'utilisation de tels anticorps dans le ChIP permettra de vérifier que le recrutement de Pol II phosphorylée au niveau de la Ser2 est plus actif lors du silençage de la CTNNB1, ZNF326 et NKRF suite à l'infection virale. D'autre part, ça sera intéressant de vérifier si un tel complexe CTNNB1-ZNF326-NKRF régule également l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires comme TNF ou des ISGs.

V.2.2.3 le potentiel thérapeutique de cibler un complexe répresseur NKRF-CTNNB1 comme immunmodulateur

L'étude du rôle de NKRF dans certaines maladies humaines a permis d'identifier plusieurs points communs avec la CTNNB1. Ainsi, l'expression de NKRF est augmentée dans les monocytes et les macrophages alvéolaires des patients activement atteints par *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) [624]. NKRF module ainsi la synthèse et la libération des cytokines IP-10/CXCL10 et IL-8/CXCL8. Dans ce cas, le mécanisme proposé est que NKRF joue le rôle de répresseur endogène prévenant une grande augmentation des cytokines inflammatoires chez les patients ayant une grande charge bactérienne [624]. Or, il a été démontré que dans les

macrophages infectées par Mtb, la CTNNB1 est stabilisée et régule négativement la réponse inflammatoire NF- κ B dépendante suite à l'activation des TLR2/4 [625]. De plus, dans les macrophages dérivés de sang de patients activement infectées par Mtb, plusieurs miRNAs qui ciblent l'activation de WNT/CTNNB1 se trouvent à des niveaux sur-élevés, suggérant que la voie WNT/CTNNB1 est maintenue active au cours de l'infection des macrophages pour réguler négativement et prévenir une inflammation excessive [626, 627].

Dans le cas de maladies reliées aux troubles inflammatoires, il a été rapporté que l'expression de NKRF est diminuée dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) des patients atteints de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC). La réduction de NKRF libère le promoteur d'IL-8/CXCL8 de l'effet répresseur et conduit à une production accrue de ces cytokines en réponse à la signalisation NF- κ B [628]. D'autre part, il a été observé que la signalisation WNT/CTNNB1 est diminuée chez les patients atteints de MPOC [629]. Plus important encore, dans des modèles expérimentaux murins de la maladie, l'activation de la CTNNB1 par des inhibiteurs de GSK3 a démontré son habilité à réduire les concentrations des cytokines inflammatoires TNF α et IL-1 β [630]. Ce qui suggère un rôle important de la signalisation WNT/CTNNB1 et NKRF dans la régulation négative de la signalisation de NF- κ B et de leur dérèglement lors du processus inflammatoire du MPOC. Il sera intéressant de déterminer si la CTNNB1 est requise pour l'effet repressif de NKRF dans les stades précoces de la maladie. La stabilisation de cette interaction sera bénéfique pour la réduction de l'inflammation causée par NF- κ B.

Ces observations soulignent l'importance de ce nouveau complexe protéique CTNNB1-NKRF-NF- κ B comme nouvelle approche thérapeutique dans la régulation de l'inflammation chronique, qui peut être causée par des infections virales, bactériennes ou dans des troubles immunitaires.

V.3 Conclusion

En conclusion, les travaux effectués au cours de mon projet de doctorat décrivent l'identification de nouveaux modulateurs de la voie RLR suite à l'infection par le VS. Mon projet a permis principalement la caractérisation et l'élucidation d'un nouveau rôle de l'axe WNT/CTNNB1/GSK3 dans la régulation négative de la réponse antivirale innée aux pathogènes. Nos travaux subséquents ont permis l'identification et la caractérisation de nouveaux partenaires de la CTNNB1 associés à son rôle dans la régulation de la réponse antivirale innée. Le partenaire DDB1 revêt un intérêt de toute importance car il est impliqué directement dans la régulation de la stabilité protéique de la CTNNB1. Nos données ont permis d'établir un rôle du système CUL4-DDB1 dans la stabilisation de la CTNNB1 suite à l'infection virale, résultant en la régulation négative de la réponse antivirale (**Figure V.6**). DDB1 serait impliqué également dans l'hyperactivation de la CTNNB1 dans les CCRs, ce qui fait de lui un candidat potentiel pour le ciblage thérapeutique. Une stratégie très prometteuse actuellement dans le ciblage de la signalisation WNT/CTNNB1 vise son inhibition en favorisant la dégradation de la CTNNB1 plutôt que de la dissocier des complexes protéiques [631]. D'ailleurs, l'espoir de cibler la CTNNB1 a été récemment ravivé par des découvertes démontrant que l'effet oncogénique de la signalisation WNT/CTNNB1 peut être supprimé par des petites molécules liant la CTNNB1 et favorisant sa dégradation par le protéasome [631, 632]. Ainsi, la compréhension des mécanismes

moléculaires sous-jacents aux fonctions de la machinerie CUL4-DDB1 fournira des perspectives additionnelles sur les stratégies thérapeutiques ciblant la voie WNT/CTNNB1 dans la régulation de l'immunité antivirale et le cancer.

Pour élucider les mécanismes de la régulation transcriptionnelle de l'immunité innée par la CTNNB1, nous nous sommes intéressés au candidat NKRF (**Figure V.6**). Ce répresseur transcriptionnel consolide le lien entre les deux voies WNT/CTNNB1 et NF- κ B ayant déjà un historique bien établi de régulation croisée des processus inflammatoires [321]. La compréhension des bases moléculaires de cette interaction NKRF-CTNNB1 contribuera à élucider les mécanismes physio-pathologiques sous-jacents aux maladies associées à l'inflammation et d'offrir plus d'options thérapeutiques.

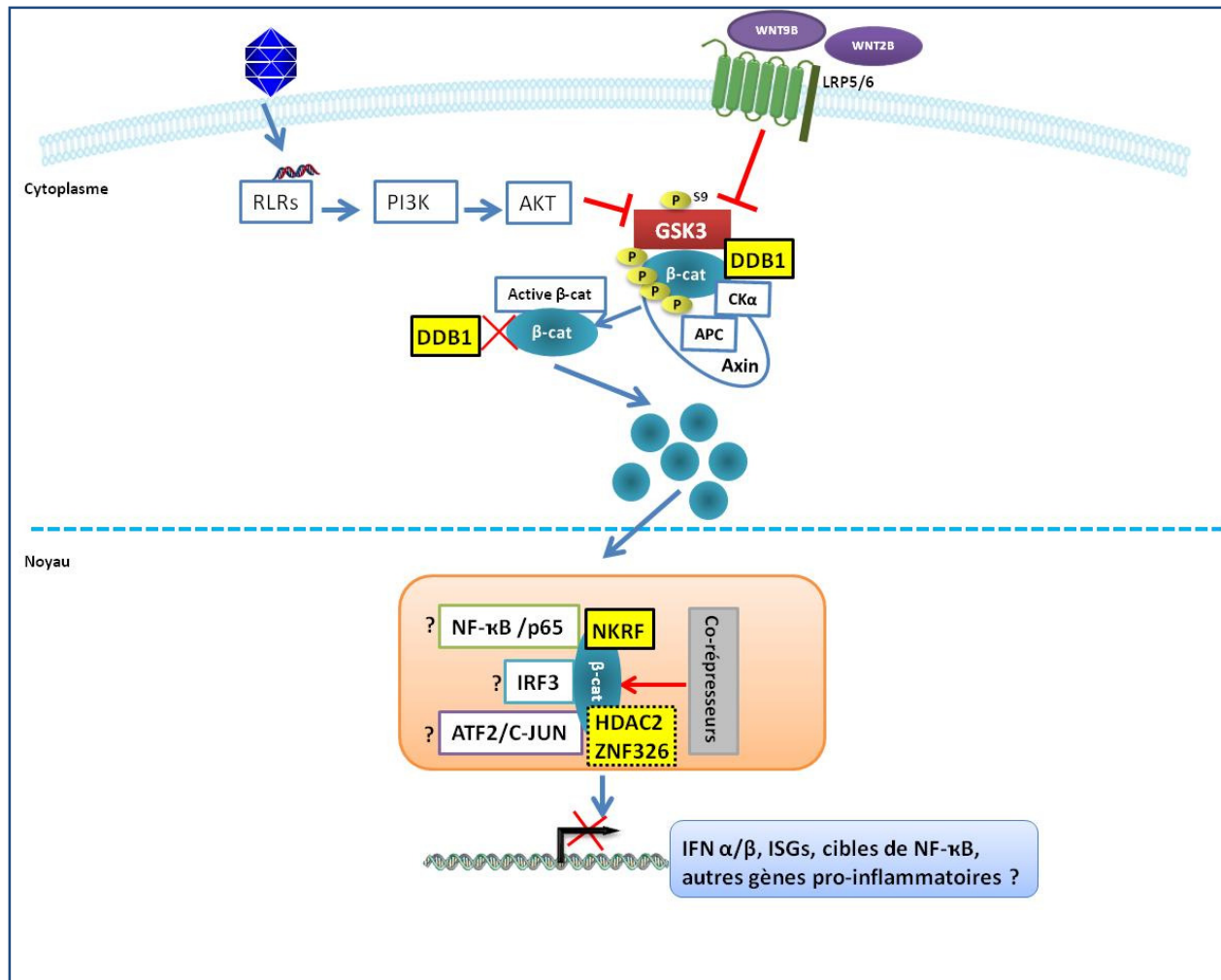


Figure V.6 : Régulation de l'immunité antivirale innée par la CTNNB1 et ses partenaires. Au niveau cytoplasmique; DDB1 est un régulateur négatif de la stabilité de la CTNNB1 d'une façon dépendante de l'activité de GSK3. Suite à l'infection virale, DDB1 permet la stabilisation de la CTNNB1, possiblement car l'induction virale induit l'inactivation de GSK3 qui entrainerait la dissociation du système CUL4-DDB1 de la CTNNB1 et ainsi la stabilisation de la CTNNB1. Au niveau nucléaire, La CTNNB1 interagit avec des répresseurs transcriptionnels comme NKRF, HDAC2 et ZNF326 afin de terminer la transcription des gènes IFNs de type I, des ISGs et probablement d'autres gènes pro-inflammatoires, possiblement en interagissant avec les facteurs de transcription NF- κ B, IRF3 et ATF2/C-JUN.

Finalement, les immuno-modulateurs que nous avons identifiés dans ce travail pourraient avoir des retombées thérapeutiques importantes sur plusieurs domaines, notamment celui de l'utilisation des virus oncolytiques (VOs) dans le traitement des tumeurs. Une stratégie actuelle pour améliorer l'efficacité thérapeutique globale de VOs consiste en la suppression transitoire de la réponse précoce d'IFNs de type I afin d'améliorer la réplication des VOs au niveau des sites tumoraux et prolonger l'infection virale [633]. Ainsi, la manipulation de la réponse anti-virale et la clairance virale de l'hôte à travers la régulation des fonctions de la CTNNB1 ou de ses nouveaux régulateurs identifiés pourrait constituer une piste thérapeutique prometteuse pour l'efficacité de la virothérapie.

Bibliographie

1. Pandey, S., T. Kawai, and S. Akira, *Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(1): p. a016246.
2. Ori, D., M. Murase, and T. Kawai, *Cytosolic nucleic acid sensors and innate immune regulation*. Int Rev Immunol, 2017. **36**(2): p. 74-88.
3. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nat Immunol, 2015. **16**(4): p. 343-53.
4. Schneider, W.M., M.D. Chevillotte, and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 513-45.
5. Tripathi, S. and A. Garcia-Sastre, *Antiviral innate immunity through the lens of systems biology*. Virus Res, 2016. **218**: p. 10-7.
6. O'Neill, L.A., D. Golenbock, and A.G. Bowie, *The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(6): p. 453-60.
7. Kawasaki, T. and T. Kawai, *Toll-like receptor signaling pathways*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 461.
8. Tesar, B.M. and D.R. Goldstein, *Toll-like receptors and their role in transplantation*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 4221-38.
9. Chen, N., et al., *RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens*. IUBMB Life, 2017. **69**(5): p. 297-304.
10. Verma, R. and K. Bharti, *Toll like receptor 3 and viral infections of nervous system*. J Neurol Sci, 2017. **372**: p. 40-48.
11. Dubourg, C., et al., *Recent advances in understanding inheritance of holoprosencephaly*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2018.
12. Sarvestani, S.T., B.R. Williams, and M.P. Gantier, *Human Toll-like receptor 8 can be cool too: implications for foreign RNA sensing*. J Interferon Cytokine Res, 2012. **32**(8): p. 350-61.
13. Majer, O., B. Liu, and G.M. Barton, *Nucleic acid-sensing TLRs: trafficking and regulation*. Curr Opin Immunol, 2017. **44**: p. 26-33.
14. Lin, S.C., Y.C. Lo, and H. Wu, *Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling*. Nature, 2010. **465**(7300): p. 885-90.
15. Tabeta, K., et al., *The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 156-64.
16. Brinkmann, M.M., et al., *The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling*. J Cell Biol, 2007. **177**(2): p. 265-75.
17. Lee, B.L., et al., *UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs*. Elife, 2013. **2**: p. e00291.
18. Tatematsu, M., et al., *LRRC59 Regulates Trafficking of Nucleic Acid-Sensing TLRs from the Endoplasmic Reticulum via Association with UNC93B1*. J Immunol, 2015. **195**(10): p. 4933-42.

19. Chiang, C.Y., et al., *Cofactors required for TLR7- and TLR9-dependent innate immune responses*. Cell Host Microbe, 2012. **11**(3): p. 306-18.
20. Luo, Z., et al., *HRS plays an important role for TLR7 signaling to orchestrate inflammation and innate immunity upon EV71 infection*. PLoS Pathog, 2017. **13**(8): p. e1006585.
21. Ramirez-Ortiz, Z.G., et al., *The receptor TREML4 amplifies TLR7-mediated signaling during antiviral responses and autoimmunity*. Nat Immunol, 2015. **16**(5): p. 495-504.
22. Ivanov, S., et al., *A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA*. Blood, 2007. **110**(6): p. 1970-81.
23. Tian, J., et al., *Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE*. Nat Immunol, 2007. **8**(5): p. 487-96.
24. Yanai, H., et al., *HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses*. Nature, 2009. **462**(7269): p. 99-103.
25. Zhu, S., et al., *Mex3B: a coreceptor to present dsRNA to TLR3*. Cell Res, 2016. **26**(4): p. 391-2.
26. Di Gioia, M. and I. Zanoni, *Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response*. Mol Immunol, 2015. **63**(2): p. 143-52.
27. Huh, H.D., et al., *STRAP positively regulates TLR3-triggered signaling pathway*. Cell Immunol, 2017. **318**: p. 55-60.
28. Huai, W., et al., *Mint3 potentiates TLR3/4- and RIG-I-induced IFN-beta expression and antiviral immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(42): p. 11925-11930.
29. Tomalka, J.A., T.J. de Jesus, and P. Ramakrishnan, *Sam68 is a regulator of Toll-like receptor signaling*. Cell Mol Immunol, 2017. **14**(1): p. 107-117.
30. Chuang, T.H. and R.J. Ulevitch, *Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2004. **5**(5): p. 495-502.
31. Ye, W., et al., *TRIM8 Negatively Regulates TLR3/4-Mediated Innate Immune Response by Blocking TRIF-TBK1 Interaction*. J Immunol, 2017. **199**(5): p. 1856-1864.
32. Hu, M.M., et al., *TRIM38 Negatively Regulates TLR3/4-Mediated Innate Immune and Inflammatory Responses by Two Sequential and Distinct Mechanisms*. J Immunol, 2015. **195**(9): p. 4415-25.
33. Liu, X., et al., *Negative regulation of TLR inflammatory signaling by the SUMO-deconjugating enzyme SENP6*. PLoS Pathog, 2013. **9**(6): p. e1003480.
34. Li, P., et al., *SIRT6 Acts as a Negative Regulator in Dengue Virus-Induced Inflammatory Response by Targeting the DNA Binding Domain of NF-kappaB p65*. Front Cell Infect Microbiol, 2018. **8**: p. 113.
35. Pisitkun, P., et al., *Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1669-72.
36. Deane, J.A., et al., *Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation*. Immunity, 2007. **27**(5): p. 801-10.

37. Newman, Z.R., et al., *Differences in codon bias and GC content contribute to the balanced expression of TLR7 and TLR9*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(10): p. E1362-71.
38. Hengge, U.R., et al., *Self-administered topical 5% imiquimod for the treatment of common warts and molluscum contagiosum*. Br J Dermatol, 2000. **143**(5): p. 1026-31.
39. Bam, R.A., et al., *TLR7 Agonist GS-9620 Is a Potent Inhibitor of Acute HIV-1 Infection in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells*. Antimicrob Agents Chemother, 2017. **61**(1).
40. Lanford, R.E., et al., *GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees*. Gastroenterology, 2013. **144**(7): p. 1508-17, 1517 e1-10.
41. Enosi Tuipulotu, D., et al., *TLR7 Agonists Display Potent Antiviral Effects against Norovirus Infection via Innate Stimulation*. Antimicrob Agents Chemother, 2018. **62**(5).
42. Vanwalscappel, B., T. Tada, and N.R. Landau, *Toll-like receptor agonist R848 blocks Zika virus replication by inducing the antiviral protein viperin*. Virology, 2018. **522**: p. 199-208.
43. Shah, M., et al., *Advances in Antiviral Therapies Targeting Toll-like Receptors*. Expert Opin Investig Drugs, 2016. **25**(4): p. 437-53.
44. Bruns, A.M. and C.M. Horvath, *LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling*. Cytokine, 2015. **74**(2): p. 198-206.
45. Saito, T., et al., *Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 582-7.
46. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 19-28.
47. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
48. Gitlin, L., et al., *Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8459-64.
49. Thompson, M.R., et al., *Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection*. Viruses, 2011. **3**(6): p. 920-40.
50. Cao, X., et al., *MDA5 plays a critical role in interferon response during hepatitis C virus infection*. J Hepatol, 2015. **62**(4): p. 771-8.
51. Fredericksen, B.L., et al., *Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1*. J Virol, 2008. **82**(2): p. 609-16.
52. Loo, Y.M., et al., *Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity*. J Virol, 2008. **82**(1): p. 335-45.
53. Schmidt, A., et al., *5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 12067-72.

54. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2851-8.
55. van der Veen, A.G., et al., *The RIG-I-like receptor LGP2 inhibits Dicer-dependent processing of long double-stranded RNA and blocks RNA interference in mammalian cells*. EMBO J, 2018. **37**(4).
56. Hu, M.M. and H.B. Shu, *Cytoplasmic Mechanisms of Recognition and Defense of Microbial Nucleic Acids*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2018.
57. Hu, M.M., et al., *Innate immunity to RNA virus is regulated by temporal and reversible sumoylation of RIG-I and MDA5*. J Exp Med, 2017. **214**(4): p. 973-989.
58. Wies, E., et al., *Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling*. Immunity, 2013. **38**(3): p. 437-49.
59. Choi, S.J., et al., *HDAC6 regulates cellular viral RNA sensing by deacetylation of RIG-I*. EMBO J, 2016. **35**(4): p. 429-42.
60. Gack, M.U., et al., *TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity*. Nature, 2007. **446**(7138): p. 916-920.
61. Hou, F., et al., *MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response*. Cell, 2011. **146**(3): p. 448-61.
62. Tan, P., et al., *Assembly of the WHIP-TRIM14-PPP6C Mitochondrial Complex Promotes RIG-I-Mediated Antiviral Signaling*. Mol Cell, 2017. **68**(2): p. 293-307 e5.
63. Wang, Y.Y., et al., *WDR5 is essential for assembly of the VISA-associated signaling complex and virus-triggered IRF3 and NF-kappaB activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(2): p. 815-20.
64. Lei, C.Q., et al., *Glycogen synthase kinase 3beta regulates IRF3 transcription factor-mediated antiviral response via activation of the kinase TBK1*. Immunity, 2010. **33**(6): p. 878-89.
65. Chen, L.T., et al., *MSX1 Modulates RLR-Mediated Innate Antiviral Signaling by Facilitating Assembly of TBK1-Associated Complexes*. J Immunol, 2016. **197**(1): p. 199-207.
66. Chan, Y.K. and M.U. Gack, *Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing*. Nat Rev Micro, 2016. **14**(6): p. 360-373.
67. Misawa, T., M. Takahama, and T. Saitoh, *Mitochondria-Endoplasmic Reticulum Contact Sites Mediate Innate Immune Responses*. Adv Exp Med Biol, 2017. **997**: p. 187-197.
68. Dixit, E., et al., *Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity*. Cell, 2010. **141**(4): p. 668-81.
69. Horner, S.M., et al., *Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(35): p. 14590-5.
70. Wanders, R.J. and H.R. Waterham, *Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 295-332.

71. Odendall, C., et al., *Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes*. Nat Immunol, 2014. **15**(8): p. 717-26.
72. Arimoto, K., et al., *Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7500-5.
73. Wang, W., et al., *RNF122 suppresses antiviral type I interferon production by targeting RIG-I CARDs to mediate RIG-I degradation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(34): p. 9581-6.
74. Zhao, C., et al., *The E3 Ubiquitin Ligase TRIM40 Attenuates Antiviral Immune Responses by Targeting MDA5 and RIG-I*. Cell Rep, 2017. **21**(6): p. 1613-1623.
75. Zhou, P., et al., *MLL5 suppresses antiviral innate immune response by facilitating STUB1-mediated RIG-I degradation*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1243.
76. Inn, K.S., et al., *Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction*. Mol Cell, 2011. **41**(3): p. 354-65.
77. Zhang, M., et al., *Regulation of IkappaB kinase-related kinases and antiviral responses by tumor suppressor CYLD*. J Biol Chem, 2008. **283**(27): p. 18621-6.
78. Cui, J., et al., *USP3 inhibits type I interferon signaling by deubiquitinating RIG-I-like receptors*. Cell Res, 2014. **24**(4): p. 400-16.
79. Fan, Y., et al., *USP21 negatively regulates antiviral response by acting as a RIG-I deubiquitinase*. J Exp Med, 2014. **211**(2): p. 313-28.
80. Zhong, H., et al., *Ubiquitin-specific proteases 25 negatively regulates virus-induced type I interferon signaling*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80976.
81. Pauli, E.K., et al., *The ubiquitin-specific protease USP15 promotes RIG-I-mediated antiviral signaling by deubiquitylating TRIM25*. Sci Signal, 2014. **7**(307): p. ra3.
82. Du, Y., et al., *LRRC25 inhibits type I IFN signaling by targeting ISG15-associated RIG-I for autophagic degradation*. EMBO J, 2018. **37**(3): p. 351-366.
83. Nguyen, N.T., et al., *Ubiquitin-like modifier FAT10 attenuates RIG-I mediated antiviral signaling by segregating activated RIG-I from its signaling platform*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23377.
84. Kitai, Y., et al., *Negative regulation of melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)-dependent antiviral innate immune responses by Arf-like protein 5B*. J Biol Chem, 2015. **290**(2): p. 1269-80.
85. Jiang, M., et al., *Self-Recognition of an Inducible Host lncRNA by RIG-I Feedback Restricts Innate Immune Response*. Cell, 2018. **173**(4): p. 906-919 e13.
86. Yoo, Y.S., et al., *The mitochondrial ubiquitin ligase MARCH5 resolves MAVS aggregates during antiviral signalling*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7910.
87. Pan, Y., et al., *Smurf2 negatively modulates RIG-I-dependent antiviral response by targeting VISA/MAVS for ubiquitination and degradation*. J Immunol, 2014. **192**(10): p. 4758-64.
88. You, F., et al., *PCBP2 mediates degradation of the adaptor MAVS via the HECT ubiquitin ligase AIP4*. Nat Immunol, 2009. **10**(12): p. 1300-8.

89. Xiang, W., et al., *PPM1A silences cytosolic RNA sensing and antiviral defense through direct dephosphorylation of MAVS and TBK1*. *Sci Adv*, 2016. **2**(7): p. e1501889.
90. Moore, C.B., et al., *NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity*. *Nature*, 2008. **451**(7178): p. 573-7.
91. Qin, Y., et al., *NLRP11 disrupts MAVS signalosome to inhibit type I interferon signaling and virus-induced apoptosis*. *EMBO Rep*, 2017. **18**(12): p. 2160-2171.
92. Han, Y., et al., *Negative regulation of MAVS-mediated innate immune response by ASC*. *Mol Cell Biochem*, 2018. **445**(1-2): p. 35-43.
93. Wang, P., et al., *UBXN1 interferes with RIG-I-like receptor-mediated antiviral immune response by targeting MAVS*. *Cell Rep*, 2013. **3**(4): p. 1057-70.
94. Refolo, G., et al., *Negative regulation of MAVS-mediated antiviral signaling by the mitochondrial protein LRPPRC during HCV infection*. *Hepatology*, 2018.
95. Brubaker, S.W., et al., *A bicistronic MAVS transcript highlights a class of truncated variants in antiviral immunity*. *Cell*, 2014. **156**(4): p. 800-11.
96. Jin, S. and J. Cui, *BST2 inhibits type I IFN (interferon) signaling by accelerating MAVS degradation through CALCOCO2-directed autophagy*. *Autophagy*, 2018. **14**(1): p. 171-172.
97. Jin, S., et al., *Tetherin Suppresses Type I Interferon Signaling by Targeting MAVS for NDP52-Mediated Selective Autophagic Degradation in Human Cells*. *Mol Cell*, 2017. **68**(2): p. 308-322 e4.
98. Meng, F., et al., *Mst1 shuts off cytosolic antiviral defense through IRF3 phosphorylation*. *Genes Dev*, 2016. **30**(9): p. 1086-100.
99. Peng, D., et al., *A Novel Function of F-Box Protein FBXO17 in Negative Regulation of Type I IFN Signaling by Recruiting PP2A for IFN Regulatory Factor 3 Deactivation*. *J Immunol*, 2017. **198**(2): p. 808-819.
100. Gu, M., et al., *Protein phosphatase PP1 negatively regulates the Toll-like receptor- and RIG-I-like receptor-triggered production of type I interferon by inhibiting IRF3 phosphorylation at serines 396 and 385 in macrophage*. *Cell Signal*, 2014. **26**(12): p. 2930-9.
101. Zhao, X., et al., *c-Cbl-mediated ubiquitination of IRF3 negatively regulates IFN-beta production and cellular antiviral response*. *Cell Signal*, 2016. **28**(11): p. 1683-93.
102. Feng, Y., et al., *LRRC25 Functions as an Inhibitor of NF-kappaB Signaling Pathway by Promoting p65/RelA for Autophagic Degradation*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13448.
103. Lu, B., et al., *Induction of INK1 by Viral Infection Negatively Regulates Antiviral Responses through Inhibiting Phosphorylation of p65 and IRF3*. *Cell Host Microbe*, 2017. **22**(1): p. 86-98 e4.
104. Chen, S., et al., *SAMHD1 suppresses innate immune responses to viral infections and inflammatory stimuli by inhibiting the NF-kappaB and interferon pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018. **115**(16): p. E3798-E3807.
105. Oshiumi, H., et al., *DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta-inducing potential*. *Eur J Immunol*, 2010. **40**(4): p. 940-8.

106. Miyashita, M., et al., *DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(18): p. 3802-19.
107. Zhang, Z., et al., *DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsRNA in dendritic cells*. Immunity, 2011. **34**(6): p. 866-78.
108. Sparrer, K.M. and M.U. Gack, *Intracellular detection of viral nucleic acids*. Curr Opin Microbiol, 2015. **26**: p. 1-9.
109. Tremblay, N., et al., *Spliceosome SNRNP200 Promotes Viral RNA Sensing and IRF3 Activation of Antiviral Response*. PLoS Pathog, 2016. **12**(7): p. e1005772.
110. Guo, H., J.B. Callaway, and J.P. Ting, *Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics*. Nat Med, 2015. **21**(7): p. 677-87.
111. Lupfer, C. and T.D. Kanneganti, *The expanding role of NLRs in antiviral immunity*. Immunol Rev, 2013. **255**(1): p. 13-24.
112. Wang, X., et al., *RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through a RIP1-RIP3-DRP1 signaling pathway*. Nat Immunol, 2014. **15**(12): p. 1126-33.
113. Hong, M., S.I. Yoon, and I.A. Wilson, *Structure and functional characterization of the RNA-binding element of the NLRX1 innate immune modulator*. Immunity, 2012. **36**(3): p. 337-47.
114. Konno, H. and G.N. Barber, *The STING controlled cytosolic-DNA activated innate immune pathway and microbial disease*. Microbes Infect, 2014. **16**(12): p. 998-1001.
115. Chen, Q., L. Sun, and Z.J. Chen, *Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing*. Nat Immunol, 2016. **17**(10): p. 1142-9.
116. Wu, J., et al., *Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA*. Science, 2013. **339**(6121): p. 826-30.
117. Bhat, N. and K.A. Fitzgerald, *Recognition of cytosolic DNA by cGAS and other STING-dependent sensors*. Eur J Immunol, 2014. **44**(3): p. 634-40.
118. Abe, T. and G.N. Barber, *Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-kappaB activation through TBK1*. J Virol, 2014. **88**(10): p. 5328-41.
119. Jonsson, K.L., et al., *IFIH1 is required for DNA sensing in human macrophages by promoting production and function of cGAMP*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14391.
120. Almine, J.F., et al., *IFIH1 and cGAS cooperate in the activation of STING during DNA sensing in human keratinocytes*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14392.
121. Takaoka, A., et al., *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 501-5.
122. Lee, M.N., et al., *Identification of regulators of the innate immune response to cytosolic DNA and retroviral infection by an integrative approach*. Nat Immunol, 2013. **14**(2): p. 179-85.
123. Yang, P., et al., *The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway*. Nat Immunol, 2010. **11**(6): p. 487-94.

124. Ferguson, B.J., et al., *DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity*. Elife, 2012. **1**: p. e00047.
125. Kondo, T., et al., *DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(8): p. 2969-74.
126. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
127. Honda, K., et al., *Regulation of the type I IFN induction: a current view*. Int Immunol, 2005. **17**(11): p. 1367-78.
128. Chinenov, Y. and T.K. Kerppola, *Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity*. Oncogene, 2001. **20**(19): p. 2438-52.
129. Panne, D., *The enhanceosome*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(2): p. 236-42.
130. Ford, E. and D. Thanos, *The transcriptional code of human IFN-beta gene expression*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(3-4): p. 328-36.
131. Noppert, S.J., K.A. Fitzgerald, and P.J. Hertzog, *The role of type I interferons in TLR responses*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(6): p. 446-57.
132. Keller, A.D. and T. Maniatis, *Identification and characterization of a novel repressor of beta-interferon gene expression*. Genes Dev, 1991. **5**(5): p. 868-79.
133. Gyory, I., et al., *PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 299-308.
134. Su, S.T., et al., *Involvement of histone demethylase LSD1 in Blimp-1-mediated gene repression during plasma cell differentiation*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(6): p. 1421-31.
135. Nourbakhsh, M. and H. Hauser, *Constitutive silencing of IFN-beta promoter is mediated by NRF (NF-kappaB-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF-kappaB*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6415-25.
136. Weill, L., E. Shestakova, and E. Bonnefoy, *Transcription factor YY1 binds to the murine beta interferon promoter and regulates its transcriptional capacity with a dual activator/repressor role*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 2903-14.
137. Siednienko, J., et al., *Nuclear factor kappaB subunits RelB and cRel negatively regulate Toll-like receptor 3-mediated beta-interferon production via induction of transcriptional repressor protein YY1*. J Biol Chem, 2011. **286**(52): p. 44750-63.
138. Labzin, L.I., et al., *ATF3 Is a Key Regulator of Macrophage IFN Responses*. J Immunol, 2015. **195**(9): p. 4446-55.
139. Ferri, F., et al., *TRIM33 switches off Ifnb1 gene transcription during the late phase of macrophage activation*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8900.
140. Meng, J., et al., *Rb selectively inhibits innate IFN-beta production by enhancing deacetylation of IFN-beta promoter through HDAC1 and HDAC8*. J Autoimmun, 2016. **73**: p. 42-53.
141. Gates, L.T. and J.L. Shisler, *cFLIPL Interrupts IRF3-CBP-DNA Interactions To Inhibit IRF3-Driven Transcription*. J Immunol, 2016. **197**(3): p. 923-33.

142. Ambrose, R.L., et al., *C6orf106 is a novel inhibitor of the interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response*. J Biol Chem, 2018. **293**(27): p. 10561-10573.
143. Wang, S., et al., *AGO2 Negatively Regulates Type I Interferon Signaling Pathway by Competition Binding IRF3 with CBP/p300*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 195.
144. Li, R., et al., *PIAS1 negatively modulates virus triggered type I IFN signaling by blocking the DNA binding activity of IRF3*. Antiviral Res, 2013. **100**(2): p. 546-54.
145. Kim, H. and B. Seed, *The transcription factor MafB antagonizes antiviral responses by blocking recruitment of coactivators to the transcription factor IRF3*. Nat Immunol, 2010. **11**(8): p. 743-50.
146. Wang, P., et al., *TRIM26 negatively regulates interferon-beta production and antiviral response through polyubiquitination and degradation of nuclear IRF3*. PLoS Pathog, 2015. **11**(3): p. e1004726.
147. Tanaka, T., M.J. Grusby, and T. Kaisho, *PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 584-91.
148. Tanaka, T., et al., *HSP70 mediates degradation of the p65 subunit of nuclear factor kappaB to inhibit inflammatory signaling*. Sci Signal, 2014. **7**(356): p. ra119.
149. Shin, C., et al., *MKRN2 is a novel ubiquitin E3 ligase for the p65 subunit of NF-kappaB and negatively regulates inflammatory responses*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 46097.
150. Arulanandam, R., et al., *VEGF-Mediated Induction of PRD1-BF1/Blimp1 Expression Sensitizes Tumor Vasculature to Oncolytic Virus Infection*. Cancer Cell, 2015. **28**(2): p. 210-24.
151. Nourbakhsh, M., K. Hoffmann, and H. Hauser, *Interferon-beta promoters contain a DNA element that acts as a position-independent silencer on the NF-kappa B site*. EMBO J, 1993. **12**(2): p. 451-9.
152. Galvin, K.M. and Y. Shi, *Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 3723-32.
153. Gordon, S., et al., *Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology*. Oncogene, 2006. **25**(8): p. 1125-42.
154. Thomas, M.J. and E. Seto, *Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key?* Gene, 1999. **236**(2): p. 197-208.
155. Mokrani, H., et al., *Binding of YY1 to the proximal region of the murine beta interferon promoter is essential to allow CBP recruitment and K8H4/K14H3 acetylation on the promoter region after virus infection*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(22): p. 8551-61.
156. Valadkhan, S. and L.S. Gunawardane, *lncRNA-mediated regulation of the interferon response*. Virus Res, 2016. **212**: p. 127-36.
157. Krawczyk, M. and B.M. Emerson, *p50-associated COX-2 extragenic RNA (PACER) activates COX-2 gene expression by occluding repressive NF-kappaB complexes*. Elife, 2014. **3**: p. e01776.

158. Liu, B., et al., *A cytoplasmic NF-kappaB interacting long noncoding RNA blocks IkappaB phosphorylation and suppresses breast cancer metastasis*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(3): p. 370-81.
159. Li, Z., et al., *The long noncoding RNA THRIL regulates TNFalpha expression through its interaction with hnRNPL*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(3): p. 1002-7.
160. Rapicavoli, N.A., et al., *A mammalian pseudogene lncRNA at the interface of inflammation and anti-inflammatory therapeutics*. *Elife*, 2013. **2**: p. e00762.
161. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1957. **147**(927): p. 258-67.
162. Dumoutier, L., et al., *Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(31): p. 32269-74.
163. Kotenko, S.V., et al., *IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(1): p. 69-77.
164. Kotenko, S.V. and J.A. Langer, *Full house: 12 receptors for 27 cytokines*. *Int Immunopharmacol*, 2004. **4**(5): p. 593-608.
165. Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. *Immunol Rev*, 2004. **202**: p. 8-32.
166. Poynter, S.J. and S.J. DeWitte-Orr, *Fish interferon-stimulated genes: The antiviral effectors*. *Dev Comp Immunol*, 2016. **65**: p. 218-225.
167. Snell, L.M., T.L. McGaha, and D.G. Brooks, *Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer*. *Trends Immunol*, 2017. **38**(8): p. 542-557.
168. Klatt, N.R., et al., *Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection*. *Immunol Rev*, 2013. **254**(1): p. 326-42.
169. Cunningham, C.R., et al., *Type I and Type II Interferon Coordinately Regulate Suppressive Dendritic Cell Fate and Function during Viral Persistence*. *PLoS Pathog*, 2016. **12**(1): p. e1005356.
170. Dussurget, O., H. Bierne, and P. Cossart, *The bacterial pathogen Listeria monocytogenes and the interferon family: type I, type II and type III interferons*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014. **4**: p. 50.
171. McNab, F., et al., *Type I interferons in infectious disease*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(2): p. 87-103.
172. Weissmann, C. and H. Weber, *The interferon genes*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1986. **33**: p. 251-300.
173. Ivashkiv, L.B. and L.T. Donlin, *Regulation of type I interferon responses*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(1): p. 36-49.
174. Valente, G., et al., *Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues*. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(9): p. 2403-12.
175. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(2): p. 163-89.

176. Zaidi, M.R. and G. Merlino, *The two faces of interferon-gamma in cancer*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(19): p. 6118-24.
177. Sheppard, P., et al., *IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 63-8.
178. Prokunina-Olsson, L., et al., *A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus*. Nat Genet, 2013. **45**(2): p. 164-71.
179. Sommereyns, C., et al., *IFN-lambda (IFN-lambda) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo*. PLoS Pathog, 2008. **4**(3): p. e1000017.
180. Eslam, M. and J. George, *Targeting IFN-lambda: therapeutic implications*. Expert Opin Ther Targets, 2016. **20**(12): p. 1425-1432.
181. Kotenko, S.V. and J.E. Durbin, *Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location*. J Biol Chem, 2017. **292**(18): p. 7295-7303.
182. Chen, K., et al., *Methyltransferase SETD2-Mediated Methylation of STAT1 Is Critical for Interferon Antiviral Activity*. Cell, 2017. **170**(3): p. 492-506 e14.
183. Chen, K., J. Liu, and X. Cao, *Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review*. J Autoimmun, 2017. **83**: p. 1-11.
184. Arimoto, K.I., et al., *Negative regulation of type I IFN signaling*. J Leukoc Biol, 2018.
185. Majoros, A., et al., *Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK-STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 29.
186. Blaszczyk, K., et al., *The unique role of STAT2 in constitutive and IFN-induced transcription and antiviral responses*. Cytokine Growth Factor Rev, 2016. **29**: p. 71-81.
187. Katsoulidis, E., et al., *The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(12): p. 749-56.
188. Mayer, I.A., et al., *The p38 MAPK pathway mediates the growth inhibitory effects of interferon-alpha in BCR-ABL-expressing cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28570-7.
189. Goh, K.C., S.J. Haque, and B.R. Williams, *p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons*. EMBO J, 1999. **18**(20): p. 5601-8.
190. Ishida, H., et al., *Involvement of p38 signaling pathway in interferon-alpha-mediated antiviral activity toward hepatitis C virus*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **321**(3): p. 722-7.
191. Platanias, L.C., *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 375-86.
192. Wang, F., et al., *Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1266-74.
193. Saleiro, D. and L.C. Platanias, *Intersection of mTOR and STAT signaling in immunity*. Trends Immunol, 2015. **36**(1): p. 21-9.
194. Fensterl, V. and G.C. Sen, *Interferon-induced Ifit proteins: their role in viral pathogenesis*. J Virol, 2015. **89**(5): p. 2462-8.

195. Schoggins, J.W., *Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis*. Curr Opin Virol, 2014. **6**: p. 40-6.
196. Schoggins, J.W. and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions*. Curr Opin Virol, 2011. **1**(6): p. 519-25.
197. Negishi, H., et al., *Beneficial innate signaling interference for antibacterial responses by a Toll-like receptor-mediated enhancement of the MKP-IRF3 axis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(49): p. 19884-9.
198. Bandyopadhyay, S.K., et al., *Transcriptional induction by double-stranded RNA is mediated by interferon-stimulated response elements without activation of interferon-stimulated gene factor 3*. J Biol Chem, 1995. **270**(33): p. 19624-9.
199. Elco, C.P., et al., *Analysis of genes induced by Sendai virus infection of mutant cell lines reveals essential roles of interferon regulatory factor 3, NF-kappaB, and interferon but not toll-like receptor 3*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 3920-9.
200. Grandvaux, N., et al., *Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes*. J Virol, 2002. **76**(11): p. 5532-9.
201. Fraser, C.S. and J.A. Doudna, *Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(1): p. 29-38.
202. Li, Y., et al., *ISG56 is a negative-feedback regulator of virus-triggered signaling and cellular antiviral response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(19): p. 7945-50.
203. Pfaller, C.K., et al., *Protein kinase PKR and RNA adenosine deaminase ADAR1: new roles for old players as modulators of the interferon response*. Curr Opin Immunol, 2011. **23**(5): p. 573-82.
204. Hull, C.M. and P.C. Bevilacqua, *Discriminating Self and Non-Self by RNA: Roles for RNA Structure, Misfolding, and Modification in Regulating the Innate Immune Sensor PKR*. Acc Chem Res, 2016. **49**(6): p. 1242-9.
205. Onomoto, K., et al., *Antiviral innate immunity and stress granule responses*. Trends Immunol, 2014. **35**(9): p. 420-8.
206. Onomoto, K., et al., *Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43031.
207. Yoneyama, M., M. Jogi, and K. Onomoto, *Regulation of antiviral innate immune signaling by stress-induced RNA granules*. J Biochem, 2016. **159**(3): p. 279-86.
208. Haller, O. and G. Kochs, *Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(1): p. 79-87.
209. Campbell, E.M., et al., *Visualization of a proteasome-independent intermediate during restriction of HIV-1 by rhesus TRIM5alpha*. J Cell Biol, 2008. **180**(3): p. 549-61.
210. Malakhov, M.P., et al., *UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 9976-81.
211. de Jong, N.W.M., et al., *Immune evasion by a staphylococcal inhibitor of myeloperoxidase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(35): p. 9439-9444.

212. Uchida, L., et al., *The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 7395.
213. Weber, M., et al., *Influenza Virus Adaptation PB2-627K Modulates Nucleocapsid Inhibition by the Pathogen Sensor RIG-I*. Cell Host & Microbe, 2015. **17**(3): p. 309-319.
214. Ramanan, P., et al., *Structural basis for Marburg virus VP35-mediated immune evasion mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(50): p. 20661-6.
215. Hatada, E. and R. Fukuda, *Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro*. J Gen Virol, 1992. **73** (Pt 12): p. 3325-9.
216. Qian, X.Y., et al., *An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure*. RNA, 1995. **1**(9): p. 948-56.
217. Donelan, N.R., C.F. Basler, and A. Garcia-Sastre, *A recombinant influenza A virus expressing an RNA-binding-defective NS1 protein induces high levels of beta interferon and is attenuated in mice*. J Virol, 2003. **77**(24): p. 13257-66.
218. Valentine, R. and G.L. Smith, *Inhibition of the RNA polymerase III-mediated dsDNA-sensing pathway of innate immunity by vaccinia virus protein E3*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 9): p. 2221-9.
219. Bitko, V., et al., *Cellular La protein shields nonsegmented negative-strand RNA viral leader RNA from RIG-I and enhances virus growth by diverse mechanisms*. J Virol, 2008. **82**(16): p. 7977-87.
220. Gack, M.U., et al., *Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I*. Cell Host Microbe, 2009. **5**(5): p. 439-49.
221. Oshiumi, H., et al., *A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses*. PLoS Pathog, 2013. **9**(8): p. e1003533.
222. Xu, C., et al., *Downregulation of microRNA miR-526a by enterovirus inhibits RIG-I-dependent innate immune response*. J Virol, 2014. **88**(19): p. 11356-68.
223. Barral, P.M., et al., *RIG-I is cleaved during picornavirus infection*. Virology, 2009. **391**(2): p. 171-6.
224. Feng, Q., et al., *Enterovirus 2Apro targets MDA5 and MAVS in infected cells*. J Virol, 2014. **88**(6): p. 3369-78.
225. Mukherjee, A., et al., *The coxsackievirus B 3C protease cleaves MAVS and TRIF to attenuate host type I interferon and apoptotic signaling*. PLoS Pathog, 2011. **7**(3): p. e1001311.
226. Li, X.D., et al., *Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(49): p. 17717-22.
227. Chatel-Chaix, L., et al., *Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses*. Cell Host Microbe, 2016. **20**(3): p. 342-356.

228. Ding, B., et al., *The Matrix Protein of Human Parainfluenza Virus Type 3 Induces Mitophagy that Suppresses Interferon Responses*. Cell Host Microbe, 2017. **21**(4): p. 538-547 e4.
229. Dalrymple, N.A., V. Cimica, and E.R. Mackow, *Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant*. MBio, 2015. **6**(3): p. e00553-15.
230. Randall, C.M., et al., *Inhibition of interferon gene activation by death-effector domain-containing proteins from the molluscum contagiosum virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(2): p. E265-72.
231. Schroder, M., M. Baran, and A.G. Bowie, *Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation*. EMBO J, 2008. **27**(15): p. 2147-57.
232. Alff, P.J., et al., *The NY-1 hantavirus Gn cytoplasmic tail coprecipitates TRAF3 and inhibits cellular interferon responses by disrupting TBK1-TRAF3 complex formation*. J Virol, 2008. **82**(18): p. 9115-22.
233. Chen, X., et al., *SARS coronavirus papain-like protease inhibits the type I interferon signaling pathway through interaction with the STING-TRAF3-TBK1 complex*. Protein Cell, 2014. **5**(5): p. 369-81.
234. Talon, J., et al., *Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein*. J Virol, 2000. **74**(17): p. 7989-96.
235. Irie, T., et al., *Inhibition of interferon regulatory factor 3 activation by paramyxovirus V protein*. J Virol, 2012. **86**(13): p. 7136-45.
236. Matthews, K., et al., *The SARS coronavirus papain like protease can inhibit IRF3 at a post activation step that requires deubiquitination activity*. Virol J, 2014. **11**: p. 209.
237. Rieder, M., et al., *Genetic dissection of interferon-antagonistic functions of rabies virus phosphoprotein: inhibition of interferon regulatory factor 3 activation is important for pathogenicity*. J Virol, 2011. **85**(2): p. 842-52.
238. Wang, S., et al., *Herpes simplex virus 1 serine/threonine kinase US3 hyperphosphorylates IRF3 and inhibits beta interferon production*. J Virol, 2013. **87**(23): p. 12814-27.
239. Bentz, G.L., J. Shackelford, and J.S. Pagano, *Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 regulates the function of interferon regulatory factor 7 by inducing its sumoylation*. J Virol, 2012. **86**(22): p. 12251-61.
240. Arnold, M.M., M. Barro, and J.T. Patton, *Rotavirus NSP1 mediates degradation of interferon regulatory factors through targeting of the dimerization domain*. J Virol, 2013. **87**(17): p. 9813-21.
241. Jennings, S., et al., *Thogoto virus ML protein suppresses IRF3 function*. Virology, 2005. **331**(1): p. 63-72.

242. Lefort, S., et al., *Binding of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-bZIP to interferon-responsive factor 3 elements modulates antiviral gene expression*. J Virol, 2007. **81**(20): p. 10950-60.
243. Melroe, G.T., et al., *Recruitment of activated IRF-3 and CBP/p300 to herpes simplex virus ICP0 nuclear foci: Potential role in blocking IFN-beta induction*. Virology, 2007. **360**(2): p. 305-21.
244. Bravo Cruz, A.G. and J.L. Shisler, *Vaccinia virus K1 ankyrin repeat protein inhibits NF-kappaB activation by preventing RelA acetylation*. J Gen Virol, 2016. **97**(10): p. 2691-2702.
245. Ember, S.W., et al., *Vaccinia virus protein C4 inhibits NF-kappaB activation and promotes virus virulence*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 10): p. 2098-108.
246. Xing, J., et al., *Herpes simplex virus 1-encoded tegument protein VP16 abrogates the production of beta interferon (IFN) by inhibiting NF-kappaB activation and blocking IFN regulatory factor 3 to recruit its coactivator CBP*. J Virol, 2013. **87**(17): p. 9788-801.
247. Wang, K., et al., *Herpes simplex virus 1 protein kinase US3 hyperphosphorylates p65/RelA and dampens NF-kappaB activation*. J Virol, 2014. **88**(14): p. 7941-51.
248. Nusse, R. and H.E. Varmus, *Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome*. Cell, 1982. **31**(1): p. 99-109.
249. Rijsewijk, F., et al., *The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless*. Cell, 1987. **50**(4): p. 649-57.
250. Willert, K. and R. Nusse, *Wnt proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a007864.
251. Cadigan, K.M. and R. Nusse, *Wnt signaling: a common theme in animal development*. Genes Dev, 1997. **11**(24): p. 3286-305.
252. Nusse, R. and H. Clevers, *Wnt/beta-Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities*. Cell, 2017. **169**(6): p. 985-999.
253. McMahon, A.P., et al., *The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1-/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum*. Cell, 1992. **69**(4): p. 581-95.
254. Stark, K., et al., *Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4*. Nature, 1994. **372**(6507): p. 679-83.
255. Kusserow, A., et al., *Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone*. Nature, 2005. **433**(7022): p. 156-60.
256. Yu, H., et al., *Frizzled 2 and frizzled 7 function redundantly in convergent extension and closure of the ventricular septum and palate: evidence for a network of interacting genes*. Development, 2012. **139**(23): p. 4383-94.
257. Dijksterhuis, J.P., et al., *Systematic mapping of WNT-FZD protein interactions reveals functional selectivity by distinct WNT-FZD pairs*. J Biol Chem, 2015. **290**(11): p. 6789-98.

258. Rios-Esteves, J. and M.D. Resh, *Stearoyl CoA desaturase is required to produce active, lipid-modified Wnt proteins*. Cell Rep, 2013. **4**(6): p. 1072-81.
259. Janda, C.Y., et al., *Structural basis of Wnt recognition by Frizzled*. Science, 2012. **337**(6090): p. 59-64.
260. Gross, J.C., et al., *Active Wnt proteins are secreted on exosomes*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(10): p. 1036-45.
261. Korkut, C., et al., *Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless*. Cell, 2009. **139**(2): p. 393-404.
262. Frederic, C.J., et al., *Synthesis of Unprecedented Sulfonlated Phosphono-exo-Glycals Designed as Inhibitors of the Three Mycobacterial Galactofuranose Processing Enzymes*. Chemistry, 2016. **22**(44): p. 15913-15920.
263. Saha, S., et al., *Macrophage-derived extracellular vesicle-packaged WNTs rescue intestinal stem cells and enhance survival after radiation injury*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13096.
264. Farin, H.F., et al., *Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche*. Nature, 2016. **530**(7590): p. 340-3.
265. Serralbo, O. and C. Marcelle, *Migrating cells mediate long-range WNT signaling*. Development, 2014. **141**(10): p. 2057-63.
266. Janda, C.Y., et al., *Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and beta-catenin signalling*. Nature, 2017. **545**(7653): p. 234-237.
267. Ho, H.Y., et al., *Wnt5a-Ror-Dishevelled signaling constitutes a core developmental pathway that controls tissue morphogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(11): p. 4044-51.
268. Huang, X., et al., *Phosphorylation of Dishevelled by protein kinase RIPK4 regulates Wnt signaling*. Science, 2013. **339**(6126): p. 1441-5.
269. Zhou, Y. and J. Nathans, *Gpr124 controls CNS angiogenesis and blood-brain barrier integrity by promoting ligand-specific canonical wnt signaling*. Dev Cell, 2014. **31**(2): p. 248-56.
270. Posokhova, E., et al., *GPRI24 functions as a WNT7-specific coactivator of canonical beta-catenin signaling*. Cell Rep, 2015. **10**(2): p. 123-30.
271. Rao, T.P. and M. Kuhl, *An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more*. Circ Res, 2010. **106**(12): p. 1798-806.
272. Niehrs, C., *The complex world of WNT receptor signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(12): p. 767-79.
273. Kikuchi, A., et al., *New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation*. Int Rev Cell Mol Biol, 2011. **291**: p. 21-71.
274. Valenta, T., G. Hausmann, and K. Basler, *The many faces and functions of beta-catenin*. EMBO J, 2012. **31**(12): p. 2714-36.
275. Ozawa, M., H. Baribault, and R. Kemler, *The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species*. EMBO J, 1989. **8**(6): p. 1711-7.

276. Wieschaus, E., C. Nusslein-Volhard, and G. Jurgens, *Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in Drosophila melanogaster : III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome*. Wilhelm Roux Arch Dev Biol, 1984. **193**(5): p. 296-307.
277. Nusslein-Volhard, C., E. Wieschaus, and H. Kluding, *Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in Drosophila melanogaster : I. Zygotic loci on the second chromosome*. Wilhelm Roux Arch Dev Biol, 1984. **193**(5): p. 267-282.
278. Stamos, J.L. and W.I. Weis, *The beta-catenin destruction complex*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(1): p. a007898.
279. Hsu, W., L. Zeng, and F. Costantini, *Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3439-45.
280. Seeling, J.M., et al., *Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A*. Science, 1999. **283**(5410): p. 2089-91.
281. Ratcliffe, M.J., K. Itoh, and S.Y. Sokol, *A positive role for the PP2A catalytic subunit in Wnt signal transduction*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35680-3.
282. Yamamoto, H., et al., *Inhibition of the Wnt signaling pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 26875-82.
283. Amit, S., et al., *Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway*. Genes Dev, 2002. **16**(9): p. 1066-76.
284. Liu, C., et al., *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. Cell, 2002. **108**(6): p. 837-47.
285. Yost, C., et al., *The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in Xenopus embryos by glycogen synthase kinase 3*. Genes Dev, 1996. **10**(12): p. 1443-54.
286. Hagen, T., et al., *Expression and characterization of GSK-3 mutants and their effect on beta-catenin phosphorylation in intact cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23330-5.
287. Wu, G. and X. He, *Threonine 41 in beta-catenin serves as a key phosphorylation relay residue in beta-catenin degradation*. Biochemistry, 2006. **45**(16): p. 5319-23.
288. Orford, K., et al., *Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 24735-8.
289. Wu, G., et al., *Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase*. Mol Cell, 2003. **11**(6): p. 1445-56.
290. Bilic, J., et al., *Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation*. Science, 2007. **316**(5831): p. 1619-22.
291. Zeng, X., et al., *Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions*. Development, 2008. **135**(2): p. 367-75.
292. Mao, J., et al., *Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway*. Mol Cell, 2001. **7**(4): p. 801-9.

293. Zeng, X., et al., *A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation*. Nature, 2005. **438**(7069): p. 873-7.
294. Cselenyi, C.S., et al., *LRP6 transduces a canonical Wnt signal independently of Axin degradation by inhibiting GSK3's phosphorylation of beta-catenin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(23): p. 8032-7.
295. Piao, S., et al., *Direct inhibition of GSK3beta by the phosphorylated cytoplasmic domain of LRP6 in Wnt/beta-catenin signaling*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e4046.
296. Su, Y., et al., *APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase*. Mol Cell, 2008. **32**(5): p. 652-61.
297. Li, V.S., et al., *Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1245-56.
298. Azzolin, L., et al., *YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response*. Cell, 2014. **158**(1): p. 157-70.
299. Kohler, E.M., et al., *Beta-catenin degradation mediated by the CID domain of APC provides a model for the selection of APC mutations in colorectal, desmoid and duodenal tumours*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(2): p. 213-26.
300. Roberts, D.M., et al., *Deconstructing the sscatenin destruction complex: mechanistic roles for the tumor suppressor APC in regulating Wnt signaling*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(11): p. 1845-63.
301. Choi, S.H., et al., *alpha-Catenin interacts with APC to regulate beta-catenin proteolysis and transcriptional repression of Wnt target genes*. Genes Dev, 2013. **27**(22): p. 2473-88.
302. Pronobis, M.I., N.M. Rusan, and M. Peifer, *A novel GSK3-regulated APC:Axin interaction regulates Wnt signaling by driving a catalytic cycle of efficient betacatenin destruction*. Elife, 2015. **4**: p. e08022.
303. Archbold, H.C., et al., *How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/beta-catenin pathway*. Acta Physiol (Oxf), 2012. **204**(1): p. 74-109.
304. van de Wetering, M., et al., *Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF*. Cell, 1997. **88**(6): p. 789-99.
305. Mulholland, D.J., et al., *Functional localization and competition between the androgen receptor and T-cell factor for nuclear beta-catenin: a means for inhibition of the Tcf signaling axis*. Oncogene, 2003. **22**(36): p. 5602-13.
306. Pawlowski, J.E., et al., *Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20702-10.
307. Kouzmenko, A.P., et al., *Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40255-8.
308. Botrugno, O.A., et al., *Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 499-509.
309. Wagner, R.T., et al., *Canonical Wnt/beta-catenin regulation of liver receptor homolog-1 mediates pluripotency gene expression*. Stem Cells, 2010. **28**(10): p. 1794-804.

310. Kaidi, A., A.C. Williams, and C. Paraskeva, *Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(2): p. 210-7.
311. Essers, M.A., et al., *Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling*. Science, 2005. **308**(5725): p. 1181-4.
312. Manolagas, S.C. and M. Almeida, *Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(11): p. 2605-14.
313. Jin, T., I. George Fantus, and J. Sun, *Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin*. Cell Signal, 2008. **20**(10): p. 1697-704.
314. Almeida, M., *Unraveling the role of FoxOs in bone--insights from mouse models*. Bone, 2011. **49**(3): p. 319-27.
315. Liu, H., et al., *Wnt signaling regulates hepatic metabolism*. Sci Signal, 2011. **4**(158): p. ra6.
316. Sinner, D., et al., *Sox17 and beta-catenin cooperate to regulate the transcription of endodermal genes*. Development, 2004. **131**(13): p. 3069-80.
317. de Jaime-Soguero, A., W.A. Abreu de Oliveira, and F. Lluís, *The Pleiotropic Effects of the Canonical Wnt Pathway in Early Development and Pluripotency*. Genes (Basel), 2018. **9**(2).
318. Kelly, K.F., et al., *beta-catenin enhances Oct-4 activity and reinforces pluripotency through a TCF-independent mechanism*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(2): p. 214-27.
319. Tian, X., et al., *Association of beta-catenin with P-Smad3 but not LEF-1 dissociates in vitro profibrotic from anti-inflammatory effects of TGF-beta1*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 1): p. 67-76.
320. Pang, M., et al., *Autophagy links beta-catenin and Smad signaling to promote epithelial-mesenchymal transition via upregulation of integrin linked kinase*. Int J Biochem Cell Biol, 2016. **76**: p. 123-34.
321. Ma, B. and M.O. Hottiger, *Crosstalk between Wnt/beta-Catenin and NF-kappaB Signaling Pathway during Inflammation*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 378.
322. Deng, J., et al., *beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer*. Cancer Cell, 2002. **2**(4): p. 323-34.
323. Kim, J.H., et al., *Transcriptional regulation of a metastasis suppressor gene by Tip60 and beta-catenin complexes*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 921-6.
324. Ma, B., C.A. van Blitterswijk, and M. Karperien, *A Wnt/beta-catenin negative feedback loop inhibits interleukin-1-induced matrix metalloproteinase expression in human articular chondrocytes*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(8): p. 2589-600.
325. Sun, J., et al., *Crosstalk between NF-kappaB and beta-catenin pathways in bacterial-colonized intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(1): p. G129-37.
326. Duan, Y., et al., *beta-Catenin activity negatively regulates bacteria-induced inflammation*. Lab Invest, 2007. **87**(6): p. 613-24.

327. Ma, B., M. Fey, and M.O. Hottiger, *WNT/beta-catenin signaling inhibits CBP-mediated RelA acetylation and expression of proinflammatory NF-kappaB target genes*. J Cell Sci, 2015. **128**(14): p. 2430-6.
328. Die, L., et al., *Glycogen synthase kinase-3 beta inhibitor suppresses Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced CD40 expression by inhibiting nuclear factor-kappa B activation in mouse osteoblasts*. Mol Immunol, 2012. **52**(1): p. 38-49.
329. Jiang, R., et al., *Survival and inflammation promotion effect of PTPRO in fulminant hepatitis is associated with NF-kappaB activation*. J Immunol, 2014. **193**(10): p. 5161-70.
330. Zhu, J., C.B. Coyne, and S.N. Sarkar, *PKC alpha regulates Sendai virus-mediated interferon induction through HDAC6 and beta-catenin*. EMBO J, 2011. **30**(23): p. 4838-49.
331. Khan, K.A., et al., *Fine-Tuning of the RIG-I-Like Receptor/Interferon Regulatory Factor 3-Dependent Antiviral Innate Immune Response by the Glycogen Synthase Kinase 3/beta-Catenin Pathway*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(17): p. 3029-43.
332. Koopmans, T., et al., *beta-Catenin Directs Nuclear Factor-kappaB p65 Output via CREB-Binding Protein/p300 in Human Airway Smooth Muscle*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1086.
333. Gwak, J., et al., *Protein-kinase-C-mediated beta-catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/beta-catenin pathway*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 22): p. 4702-9.
334. Park, C.S., et al., *Modulation of beta-catenin by cyclin-dependent kinase 6 in Wnt-stimulated cells*. Eur J Cell Biol, 2007. **86**(2): p. 111-23.
335. Park, C.S., et al., *Modulation of beta-catenin phosphorylation/degradation by cyclin-dependent kinase 2*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 19592-9.
336. Hino, S., et al., *Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(20): p. 9063-72.
337. David, M.D., et al., *Signalling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential beta-catenin phosphorylation*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 16): p. 2718-30.
338. Nager, M., et al., *Nuclear phosphorylated Y142 beta-catenin accumulates in astrocytomas and glioblastomas and regulates cell invasion*. Cell Cycle, 2015. **14**(22): p. 3644-55.
339. Piedra, J., et al., *p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(7): p. 2287-97.
340. Bhardwaj, D., et al., *Phosphorylated Tyr142 beta-catenin localizes to centrosomes and is regulated by Syk*. J Cell Biochem, 2018. **119**(4): p. 3632-3640.
341. van Veelen, W., et al., *beta-catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis*. Gut, 2011. **60**(9): p. 1204-12.

342. Fang, D., et al., *Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11221-9.
343. Gao, C., G. Xiao, and J. Hu, *Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by posttranslational modifications*. Cell Biosci, 2014. **4**(1): p. 13.
344. Matsuzawa, S.I. and J.C. Reed, *Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses*. Mol Cell, 2001. **7**(5): p. 915-26.
345. Dimitrova, Y.N., et al., *Direct ubiquitination of beta-catenin by Siah-1 and regulation by the exchange factor TBL1*. J Biol Chem, 2010. **285**(18): p. 13507-16.
346. Chitalia, V.C., et al., *Jade-1 inhibits Wnt signalling by ubiquitylating beta-catenin and mediates Wnt pathway inhibition by pVHL*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(10): p. 1208-16.
347. Shivanna, S., et al., *The c-Cbl ubiquitin ligase regulates nuclear beta-catenin and angiogenesis by its tyrosine phosphorylation mediated through the Wnt signaling pathway*. J Biol Chem, 2015. **290**(20): p. 12537-46.
348. Chitalia, V., et al., *c-Cbl, a ubiquitin E3 ligase that targets active beta-catenin: a novel layer of Wnt signaling regulation*. J Biol Chem, 2013. **288**(32): p. 23505-17.
349. Xue, J., et al., *Tumour suppressor TRIM33 targets nuclear beta-catenin degradation*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6156.
350. Dominguez-Brauer, C., et al., *E3 ubiquitin ligase Mule targets beta-catenin under conditions of hyperactive Wnt signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(7): p. E1148-E1157.
351. Hay-Koren, A., et al., *The EDD E3 ubiquitin ligase ubiquitinates and up-regulates beta-catenin*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(3): p. 399-411.
352. Shekhar, M.P., et al., *Rad6B is a positive regulator of beta-catenin stabilization*. Cancer Res, 2008. **68**(6): p. 1741-50.
353. Gerard, B., et al., *Lysine 394 is a novel Rad6B-induced ubiquitination site on beta-catenin*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(10): p. 1686-96.
354. Dao, K.H., et al., *FANCL ubiquitinates beta-catenin and enhances its nuclear function*. Blood, 2012. **120**(2): p. 323-34.
355. Li, Z., et al., *Ube2s stabilizes beta-Catenin through K11-linked polyubiquitination to promote mesendoderm specification and colorectal cancer development*. Cell Death Dis, 2018. **9**(5): p. 456.
356. Wolf, D., et al., *Acetylation of beta-catenin by CREB-binding protein (CBP)*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25562-7.
357. Levy, L., et al., *Acetylation of beta-catenin by p300 regulates beta-catenin-Tcf4 interaction*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(8): p. 3404-14.
358. Ge, X., et al., *PCAF acetylates {beta}-catenin and improves its stability*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(1): p. 419-27.
359. Hart, M., et al., *The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell*. Curr Biol, 1999. **9**(4): p. 207-10.
360. Topol, L., et al., *Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation*. J Cell Biol, 2003. **162**(5): p. 899-908.

361. Kremenevskaja, N., et al., *Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma*. *Oncogene*, 2005. **24**(13): p. 2144-54.
362. Yuzugullu, H., et al., *Canonical Wnt signaling is antagonized by noncanonical Wnt5a in hepatocellular carcinoma cells*. *Mol Cancer*, 2009. **8**: p. 90.
363. Toyama, T., et al., *Noncanonical Wnt11 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration*. *Mol Cancer Res*, 2010. **8**(2): p. 254-65.
364. Kim, S.I., et al., *Cyclin-dependent kinase 2 regulates the interaction of Axin with beta-catenin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **317**(2): p. 478-83.
365. Hayward, P., T. Kalmar, and A.M. Arias, *Wnt/Notch signalling and information processing during development*. *Development*, 2008. **135**(3): p. 411-24.
366. Kwon, C., et al., *Notch post-translationally regulates beta-catenin protein in stem and progenitor cells*. *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(10): p. 1244-51.
367. Hayward, P., et al., *Notch modulates Wnt signalling by associating with Armadillo/beta-catenin and regulating its transcriptional activity*. *Development*, 2005. **132**(8): p. 1819-30.
368. Mak, B.C., et al., *The tuberlin-hamartin complex negatively regulates beta-catenin signaling activity*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(8): p. 5947-51.
369. Kramps, T., et al., *Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex*. *Cell*, 2002. **109**(1): p. 47-60.
370. Brembeck, F.H., et al., *Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions*. *Genes Dev*, 2004. **18**(18): p. 2225-30.
371. Piedra, J., et al., *Regulation of beta-catenin structure and activity by tyrosine phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(23): p. 20436-43.
372. Tian, Q., et al., *Proteomic analysis identifies that 14-3-3zeta interacts with beta-catenin and facilitates its activation by Akt*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(43): p. 15370-5.
373. Liu, X., et al., *Salmonella regulation of intestinal stem cells through the Wnt/beta-catenin pathway*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(5): p. 911-6.
374. Brown, J.B., et al., *Epithelial phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for beta-catenin activation and host defense against Citrobacter rodentium infection*. *Infect Immun*, 2011. **79**(5): p. 1863-72.
375. Gantner, B.N., et al., *The Akt1 isoform is required for optimal IFN-beta transcription through direct phosphorylation of beta-catenin*. *J Immunol*, 2012. **189**(6): p. 3104-11.
376. Kim, W., M. Kim, and E.H. Jho, *Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus*. *Biochem J*, 2013. **450**(1): p. 9-21.
377. Wu, X., et al., *Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling*. *Cell*, 2008. **133**(2): p. 340-53.
378. Liu, J., et al., *Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein*. *Mol Cell*, 2001. **7**(5): p. 927-36.

379. Jang, K.L., et al., *Up-regulation of beta-catenin by a viral oncogene correlates with inhibition of the seven in absentia homolog 1 in B lymphoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18431-6.
380. Chang, C.T., et al., *A new approach to the synthesis of polyunsaturated deuterated isoprostanes: total synthesis of d4-5-epi-8,12-iso-iPF3alpha-VI and d4-8,12-iso-iPF3alpha-VI*. Bioorg Med Chem Lett, 2009. **19**(23): p. 6755-8.
381. Dominguez-Brauer, C., et al., *Mule Regulates the Intestinal Stem Cell Niche via the Wnt Pathway and Targets EphB3 for Proteasomal and Lysosomal Degradation*. Cell Stem Cell, 2016. **19**(2): p. 205-16.
382. Hoffmeyer, K., et al., *Trimethylation and Acetylation of beta-Catenin at Lysine 49 Represent Key Elements in ESC Pluripotency*. Cell Rep, 2017. **18**(12): p. 2815-2824.
383. Firestein, R., et al., *The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e2020.
384. Winer, I.S., et al., *Lysine residues Lys-19 and Lys-49 of beta-catenin regulate its levels and function in T cell factor transcriptional activation and neoplastic transformation*. J Biol Chem, 2006. **281**(36): p. 26181-7.
385. Staal, F.J., T.C. Luis, and M.M. Tiemessen, *WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 581-93.
386. Shi, J., et al., *Emerging Role and Therapeutic Implication of Wnt Signaling Pathways in Autoimmune Diseases*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 9392132.
387. Silva-Garcia, O., J.J. Valdez-Alarcon, and V.M. Baizabal-Aguirre, *The Wnt/beta-catenin signaling pathway controls the inflammatory response in infections caused by pathogenic bacteria*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 310183.
388. Marcato, V., et al., *beta-Catenin Upregulates the Constitutive and Virus-Induced Transcriptional Capacity of the Interferon Beta Promoter through T-Cell Factor Binding Sites*. Mol Cell Biol, 2016. **36**(1): p. 13-29.
389. Suryawanshi, A., et al., *Modulation of Inflammatory Responses by Wnt/beta-Catenin Signaling in Dendritic Cells: A Novel Immunotherapy Target for Autoimmunity and Cancer*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 460.
390. Sun, J., et al., *Bacterial activation of beta-catenin signaling in human epithelia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(1): p. G220-7.
391. Ye, Z., et al., *Salmonella effector AvrA regulation of colonic epithelial cell inflammation by deubiquitination*. Am J Pathol, 2007. **171**(3): p. 882-92.
392. Liu, X., et al., *Wingless homolog Wnt11 suppresses bacterial invasion and inflammation in intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **301**(6): p. G992-G1003.
393. Liu, X., et al., *Wnt2 inhibits enteric bacterial-induced inflammation in intestinal epithelial cells*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(3): p. 418-29.
394. Gopal, A., et al., *Shigella dysenteriae infection activates proinflammatory response through beta-catenin/NF-kappaB signaling pathway*. PLoS One, 2017. **12**(4): p. e0174943.

395. Neumann, J., et al., *Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages*. FASEB J, 2010. **24**(11): p. 4599-612.
396. Chattopadhyay, S., et al., *Inhibition of viral pathogenesis and promotion of the septic shock response to bacterial infection by IRF-3 are regulated by the acetylation and phosphorylation of its coactivators*. MBio, 2013. **4**(2).
397. Ding, C., et al., *beta-catenin regulates IRF3-mediated innate immune signalling in colorectal cancer*. Cell Prolif, 2018. **51**(5): p. e12464.
398. Martin, M., et al., *Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3*. Nat Immunol, 2005. **6**(8): p. 777-84.
399. Wang, H., et al., *IFN-beta production by TLR4-stimulated innate immune cells is negatively regulated by GSK3-beta*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6797-802.
400. Wang, J.T., et al., *Glycogen synthase kinase 3 negatively regulates IFN regulatory factor 3 transactivation through phosphorylation at its linker region*. Innate Immun, 2014. **20**(1): p. 78-87.
401. Khanizadeh, S., et al., *Interaction of viral oncogenic proteins with the Wnt signaling pathway*. Iran J Basic Med Sci, 2018. **21**(7): p. 651-659.
402. Irshad, M., P. Gupta, and K. Irshad, *Molecular basis of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus infection*. World J Hepatol, 2017. **9**(36): p. 1305-1314.
403. Wang, W., et al., *Action and function of Wnt/beta-catenin signaling in the progression from chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol, 2017. **52**(4): p. 419-431.
404. Bose, S.K., et al., *Hepatitis C virus induces epithelial-mesenchymal transition in primary human hepatocytes*. J Virol, 2012. **86**(24): p. 13621-8.
405. Street, A., et al., *Hepatitis C virus NS5A-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase results in stabilization of cellular beta-catenin and stimulation of beta-catenin-responsive transcription*. J Virol, 2005. **79**(8): p. 5006-16.
406. Park, C.Y., et al., *Nonstructural 5A protein activates beta-catenin signaling cascades: implication of hepatitis C virus-induced liver pathogenesis*. J Hepatol, 2009. **51**(5): p. 853-64.
407. Milward, A., J. Mankouri, and M. Harris, *Hepatitis C virus NS5A protein interacts with beta-catenin and stimulates its transcriptional activity in a phosphoinositide-3 kinase-dependent fashion*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 2): p. 373-81.
408. Higgs, M.R., H. Lerat, and J.M. Pawlowsky, *Hepatitis C virus-induced activation of beta-catenin promotes c-Myc expression and a cascade of pro-carcinogenic events*. Oncogene, 2013. **32**(39): p. 4683-93.
409. Fukutomi, T., et al., *Hepatitis C virus core protein stimulates hepatocyte growth: correlation with upregulation of wnt-1 expression*. Hepatology, 2005. **41**(5): p. 1096-105.
410. Liu, J., et al., *Enhancement of canonical Wnt/beta-catenin signaling activity by HCV core protein promotes cell growth of hepatocellular carcinoma cells*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27496.

411. Liu, J., et al., *Hepatitis C virus core protein activates Wnt/beta-catenin signaling through multiple regulation of upstream molecules in the SMMC-7721 cell line*. Arch Virol, 2011. **156**(6): p. 1013-23.
412. Umer, M., et al., *Promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitors in hepatitis C virus - induced multistep hepatocarcinogenesis*. Virol J, 2014. **11**: p. 117.
413. Quan, H., et al., *Hepatitis C virus core protein epigenetically silences SFRP1 and enhances HCC aggressiveness by inducing epithelial-mesenchymal transition*. Oncogene, 2014. **33**(22): p. 2826-35.
414. Ripoli, M., et al., *Hypermethylated levels of E-cadherin promoter in Huh-7 cells expressing the HCV core protein*. Virus Res, 2011. **160**(1-2): p. 74-81.
415. Konstantinou, D. and M. Deutsch, *The spectrum of HBV/HCV coinfection: epidemiology, clinical characteristics, viral interactions and management*. Ann Gastroenterol, 2015. **28**(2): p. 221-228.
416. van Zuylen, W.J., W.D. Rawlinson, and C.E. Ford, *The Wnt pathway: a key network in cell signalling dysregulated by viruses*. Rev Med Virol, 2016. **26**(5): p. 340-55.
417. Cha, M.Y., et al., *Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells*. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1683-93.
418. Hsieh, A., et al., *Hepatitis B viral X protein interacts with tumor suppressor adenomatous polyposis coli to activate Wnt/beta-catenin signaling*. Cancer Lett, 2011. **300**(2): p. 162-72.
419. Srisuttee, R., et al., *Hepatitis B virus X (HBX) protein upregulates beta-catenin in a human hepatic cell line by sequestering SIRT1 deacetylase*. Oncol Rep, 2012. **28**(1): p. 276-82.
420. Xie, Q., et al., *Epigenetic silencing of SFRP1 and SFRP5 by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell tumorigenicity through Wnt signaling pathway*. Int J Cancer, 2014. **135**(3): p. 635-46.
421. Bello, J.O., et al., *Regulation of the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins*. Viruses, 2015. **7**(8): p. 4734-55.
422. Bonilla-Delgado, J., et al., *The E6 oncoprotein from HPV16 enhances the canonical Wnt/beta-catenin pathway in skin epidermis in vivo*. Mol Cancer Res, 2012. **10**(2): p. 250-8.
423. Fragoso-Ontiveros, V., et al., *Gene expression profiles induced by E6 from non-European HPV18 variants reveals a differential activation on cellular processes driving to carcinogenesis*. Virology, 2012. **432**(1): p. 81-90.
424. You, S., et al., *EBV-encoded LMP1 increases nuclear beta-catenin accumulation and its transcriptional activity in nasopharyngeal carcinoma*. Tumour Biol, 2011. **32**(4): p. 623-30.
425. QingLing, Z., et al., *LMP1 antagonizes WNT/beta-catenin signalling through inhibition of WTX and promotes nasopharyngeal dysplasia but not tumourigenesis in LMP1(B95-8) transgenic mice*. J Pathol, 2011. **223**(5): p. 574-83.

426. Fujimuro, M., et al., *A novel viral mechanism for dysregulation of beta-catenin in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency*. Nat Med, 2003. **9**(3): p. 300-6.
427. Angelova, M., et al., *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G-protein coupled receptor activates the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway*. Virol J, 2014. **11**: p. 218.
428. Henderson, L.J. and L. Al-Harthi, *Role of beta-catenin/TCF-4 signaling in HIV replication and pathogenesis: insights to informing novel anti-HIV molecular therapeutics*. J Neuroimmune Pharmacol, 2011. **6**(2): p. 247-59.
429. Wortman, B., et al., *Evidence for regulation of long terminal repeat transcription by Wnt transcription factor TCF-4 in human astrocytic cells*. J Virol, 2002. **76**(21): p. 11159-65.
430. Wang, Y., et al., *HIV-1 gp120 Upregulates Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Expression in BV2 Cells via the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway*. J Mol Neurosci, 2017. **62**(2): p. 199-208.
431. More, S., et al., *Regulation of influenza virus replication by Wnt/beta-catenin signaling*. PLoS One, 2018. **13**(1): p. e0191010.
432. Hillesheim, A., et al., *beta-catenin promotes the type I IFN synthesis and the IFN-dependent signaling response but is suppressed by influenza A virus-induced RIG-I/NF-kappaB signaling*. Cell Commun Signal, 2014. **12**: p. 29.
433. Harmon, B., et al., *A Genome-Wide RNA Interference Screen Identifies a Role for Wnt/beta-Catenin Signaling during Rift Valley Fever Virus Infection*. J Virol, 2016. **90**(16): p. 7084-97.
434. Maluquer de Motes, C. and G.L. Smith, *Vaccinia virus protein A49 activates Wnt signalling by targetting the E3 ligase beta-TrCP*. J Gen Virol, 2017.
435. Morrison, J.A., A.J. Klingelutz, and N. Raab-Traub, *Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A activates beta-catenin signaling in epithelial cells*. J Virol, 2003. **77**(22): p. 12276-84.
436. Zhao, J., et al., *Genome-wide identification of Epstein-Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells*. Cancer, 2013. **119**(2): p. 304-12.
437. Wong, A.M., et al., *Profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma reveals potential biomarkers and oncomirs*. Cancer, 2012. **118**(3): p. 698-710.
438. Tian, X., et al., *Role of hepatitis B surface antigen in the development of hepatocellular carcinoma: regulation of lymphoid enhancer-binding factor 1*. J Exp Clin Cancer Res, 2009. **28**: p. 58.
439. Daud, M., et al., *Modulation of Wnt signaling pathway by hepatitis B virus*. Arch Virol, 2017. **162**(10): p. 2937-2947.
440. Kim, S.J., et al., *Activation of beta-catenin by inhibitors of glycogen synthase kinase-3 ameliorates cisplatin-induced cytotoxicity and pro-inflammatory cytokine expression in HEI-OC1 cells*. Toxicology, 2014. **320**: p. 74-82.

441. Hao, H.P., et al., *LiCl inhibits PRRSV infection by enhancing Wnt/beta-catenin pathway and suppressing inflammatory responses*. Antiviral Res, 2015. **117**: p. 99-109.
442. Ke, B., et al., *beta-catenin regulates innate and adaptive immunity in mouse liver ischemia-reperfusion injury*. Hepatology, 2013. **57**(3): p. 1203-14.
443. Alastalo, T.P., et al., *Disruption of PPARgamma/beta-catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival*. J Clin Invest, 2011. **121**(9): p. 3735-46.
444. Liu, J., et al., *Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(15): p. 5827-37.
445. Hooeboom, D., et al., *Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity*. J Biol Chem, 2008. **283**(14): p. 9224-30.
446. Yan, Y. and M.R. Lackner, *FOXO3a and beta-catenin co-localization: double trouble in colon cancer?* Nat Med, 2012. **18**(6): p. 854-6.
447. Lin, R., *Crosstalk between Vitamin D Metabolism, VDR Signalling, and Innate Immunity*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 1375858.
448. Shah, S., et al., *The molecular basis of vitamin D receptor and beta-catenin crossregulation*. Mol Cell, 2006. **21**(6): p. 799-809.
449. Cohen, S.B., et al., *Beta-catenin signaling drives differentiation and proinflammatory function of IRF8-dependent dendritic cells*. J Immunol, 2015. **194**(1): p. 210-22.
450. Chancey, C., et al., *The global ecology and epidemiology of West Nile virus*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 376230.
451. Fredericks, A.C. and A. Fernandez-Sesma, *The burden of dengue and chikungunya worldwide: implications for the southern United States and California*. Ann Glob Health, 2014. **80**(6): p. 466-75.
452. Siedner, M.J. and J.D. Kraemer, *The end of the Ebola virus disease epidemic: has the work just begun?* Lancet Glob Health, 2017.
453. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. Cell, 2005. **122**(5): p. 669-82.
454. Meylan, E., et al., *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1167-72.
455. Xu, L.G., et al., *VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling*. Mol Cell, 2005. **19**(6): p. 727-40.
456. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 981-8.
457. Komuro, A., D. Bammig, and C.M. Horvath, *Negative regulation of cytoplasmic RNA-mediated antiviral signaling*. Cytokine, 2008. **43**(3): p. 350-8.
458. Liang, Y., et al., *Antiviral suppression vs restoration of RIG-I signaling by hepatitis C protease and polymerase inhibitors*. Gastroenterology, 2008. **135**(5): p. 1710-1718 e2.
459. Cronin, S.J., et al., *Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection*. Science, 2009. **325**(5938): p. 340-3.

460. Valanne, S., et al., *Genome-wide RNA interference in Drosophila cells identifies G protein-coupled receptor kinase 2 as a conserved regulator of NF-kappaB signaling*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6188-98.
461. Zhang, X.D., *A new method with flexible and balanced control of false negatives and false positives for hit selection in RNA interference high-throughput screening assays*. J Biomol Screen, 2007. **12**(5): p. 645-55.
462. Hutten, S. and R.H. Kehlenbach, *CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(4): p. 193-201.
463. Kimura, T., et al., *CRM1-dependent, but not ARE-mediated, nuclear export of IFN-alpha1 mRNA*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 11): p. 2259-70.
464. Cullen, B.R., *Nuclear mRNA export: insights from virology*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(8): p. 419-24.
465. Yedavalli, V.S., et al., *Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function*. Cell, 2004. **119**(3): p. 381-92.
466. Soulat, D., et al., *The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response*. EMBO J, 2008. **27**(15): p. 2135-46.
467. Brass, A.L., et al., *Identification of Host Proteins Required for HIV Infection Through a Functional Genomic Screen*. Science, 2008.
468. Konig, R., et al., *Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication*. Cell, 2008. **135**(1): p. 49-60.
469. Zhou, H., et al., *Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(5): p. 495-504.
470. Li, Q., et al., *A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009.
471. Randall, G., et al., *Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(31): p. 12884-9.
472. Karlas, A., et al., *Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication*. Nature, 2010. **463**(7282): p. 818-22.
473. Konig, R., et al., *Human host factors required for influenza virus replication*. Nature, 2010. **463**(7282): p. 813-7.
474. Shapira, S.D., et al., *A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection*. Cell, 2009. **139**(7): p. 1255-67.
475. Krishnan, M.N., et al., *RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection*. Nature, 2008. **455**(7210): p. 242-5.
476. Yeretssian, G., et al., *Non-apoptotic role of BID in inflammation and innate immunity*. Nature, 2011. **474**(7349): p. 96-9.
477. Ting, J.P., J.A. Duncan, and Y. Lei, *How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 286-90.
478. Mgbemena, V., et al., *Transactivation of inducible nitric oxide synthase gene by Kruppel-like factor 6 regulates apoptosis during influenza A virus infection*. J Immunol, 2012. **189**(2): p. 606-15.

479. Chuang, S.S., et al., *CYP2U1, a novel human thymus- and brain-specific cytochrome P450, catalyzes omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 6305-14.
480. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 781-810.
481. Semenov, M.V., et al., *SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways*. Cell, 2007. **131**(7): p. 1378.
482. Gordon, M.D., et al., *WntD is a feedback inhibitor of Dorsal/NF-kappaB in Drosophila development and immunity*. Nature, 2005. **437**(7059): p. 746-9.
483. Liu, X., et al., *Wnt2 inhibits enteric bacterial-induced inflammation in intestinal epithelial cells*. Inflamm Bowel Dis, 2011.
484. Liu, X., et al., *Wingless homolog Wnt11 suppresses bacterial invasion and inflammation in intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011.
485. Banziger, C., et al., *Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells*. Cell, 2006. **125**(3): p. 509-22.
486. Bartscherer, K., et al., *Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein*. Cell, 2006. **125**(3): p. 523-33.
487. Goodman, R.M., et al., *Sprinter: a novel transmembrane protein required for Wg secretion and signaling*. Development, 2006. **133**(24): p. 4901-11.
488. Veeman, M.T., et al., *Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements*. Curr Biol, 2003. **13**(8): p. 680-5.
489. Trosset, J.Y., et al., *Inhibition of protein-protein interactions: the discovery of druglike beta-catenin inhibitors by combining virtual and biophysical screening*. Proteins, 2006. **64**(1): p. 60-7.
490. Chatel-Chaix, L., et al., *Y-box-binding protein 1 interacts with hepatitis C virus NS3/4A and influences the equilibrium between viral RNA replication and infectious particle production*. J Virol, 2011. **85**(21): p. 11022-37.
491. Kubo, F., M. Takeichi, and S. Nakagawa, *Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone*. Development, 2003. **130**(3): p. 587-98.
492. Beurel, E., S.M. Michalek, and R.S. Jope, *Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3)*. Trends Immunol, 2010. **31**(1): p. 24-31.
493. Bose, S.K., et al., *Hepatitis C Virus Induces Epithelial Mesenchymal Transition in Primary Human Hepatocytes*. J Virol, 2012.
494. Gao, H.K., et al., *Glycogen synthase kinase 3 inhibition protects the heart from acute ischemia-reperfusion injury via inhibition of inflammation and apoptosis*. J Cardiovasc Pharmacol, 2008. **52**(3): p. 286-92.
495. Gurrieri, C., et al., *3-(2,4-dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione (SB216763), a glycogen synthase kinase-3 inhibitor, displays therapeutic properties in a mouse model of pulmonary inflammation and fibrosis*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **332**(3): p. 785-94.

496. Sanchez, J.F., et al., *Glycogen synthase kinase 3 β -mediated apoptosis of primary cortical astrocytes involves inhibition of nuclear factor kappaB signaling*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(13): p. 4649-62.
497. Takada, Y., et al., *Genetic deletion of glycogen synthase kinase-3 β abrogates activation of IkappaBalpha kinase, JNK, Akt, and p44/p42 MAPK but potentiates apoptosis induced by tumor necrosis factor*. J Biol Chem, 2004. **279**(38): p. 39541-54.
498. Yuskaitis, C.J. and R.S. Jope, *Glycogen synthase kinase-3 regulates microglial migration, inflammation, and inflammation-induced neurotoxicity*. Cell Signal, 2009. **21**(2): p. 264-73.
499. Deng, J., et al., *Crossregulation of NF-kappaB by the APC/GSK-3 β /beta-catenin pathway*. Mol Carcinog, 2004. **39**(3): p. 139-46.
500. Ke, B., et al., *beta-Catenin regulates innate and adaptive immunity in mouse liver ischemia-reperfusion injury*. Hepatology, 2012.
501. Suriano, A.R., et al., *GCF2/LRRFIP1 represses tumor necrosis factor alpha expression*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(20): p. 9073-81.
502. Cruciat, C.M., et al., *RNA helicase DDX3 is a regulatory subunit of casein kinase 1 in Wnt-beta-catenin signaling*. Science, 2013. **339**(6126): p. 1436-41.
503. Barton, G.M. and J.C. Kagan, *A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 535-42.
504. Takada, R., et al., *Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion*. Dev Cell, 2006. **11**(6): p. 791-801.
505. Willert, K., et al., *Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 448-52.
506. Raymond, V.A., et al., *Primary cultures of human hepatocytes isolated from hepatitis C virus-infected cirrhotic livers as a model to study hepatitis C infection*. Liver Int, 2009. **29**(6): p. 942-9.
507. Baril, M., et al., *MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease*. J Virol, 2009. **83**(3): p. 1299-311.
508. Berube, P., et al., *Repression of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-driven gene expression by binding of the virus to its primary cellular receptor, the CD4 molecule*. J Virol, 1996. **70**(6): p. 4009-16.
509. Lin, R., Y. Mamane, and J. Hiscott, *Multiple regulatory domains control IRF-7 activity in response to virus infection*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34320-7.
510. Sharma, S., et al., *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1148-51.
511. Kato, T., et al., *Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures*. J Virol, 2007. **81**(9): p. 4405-11.
512. Jones, C.T., et al., *Hepatitis C virus p7 and NS2 proteins are essential for production of infectious virus*. J Virol, 2007. **81**(16): p. 8374-83.
513. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.

514. Keskinen, P., et al., *Impaired antiviral response in human hepatoma cells*. Virology, 1999. **263**(2): p. 364-75.
515. Feng, X., et al., *Identification of a negative response element in the human inducible nitric-oxide synthase (hiNOS) promoter: The role of NF-kappa B-repressing factor (NRF) in basal repression of the hiNOS gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(22): p. 14212-7.
516. Hayakawa, S., et al., *ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 37-44.
517. Sun, L., et al., *Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) modulates antiviral activity of zinc-finger antiviral protein (ZAP)*. J Biol Chem, 2012. **287**(27): p. 22882-8.
518. Li, M.M., et al., *TRIM25 Enhances the Antiviral Action of Zinc-Finger Antiviral Protein (ZAP)*. PLoS Pathog, 2017. **13**(1): p. e1006145.
519. Lumb, J.H., et al., *DDX6 Represses Aberrant Activation of Interferon-Stimulated Genes*. Cell Rep, 2017. **20**(4): p. 819-831.
520. Haberland, M., R.L. Montgomery, and E.N. Olson, *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(1): p. 32-42.
521. Shakespear, M.R., et al., *Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity*. Trends Immunol, 2011. **32**(7): p. 335-43.
522. Close, P., et al., *DBIRD complex integrates alternative mRNA splicing with RNA polymerase II transcript elongation*. Nature, 2012. **484**(7394): p. 386-9.
523. Yu, X., et al., *ZNF326 promotes malignant phenotype of glioma by up-regulating HDAC7 expression and activating Wnt pathway*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 40.
524. Nourbakhsh, M., et al., *The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4501-8.
525. Huang, K.H., et al., *NF-kappaB repressing factor downregulates basal expression and mycobacterium tuberculosis induced IP-10 and IL-8 synthesis via interference with NF-kappaB in monocytes*. J Biomed Sci, 2014. **21**: p. 71.
526. Reboll, M.R., et al., *Mapping of NRF binding motifs of NF-kappaB p65 subunit*. J Biochem, 2011. **150**(5): p. 553-62.
527. Lu, Z., et al., *miR-301a as an NF-kappaB activator in pancreatic cancer cells*. EMBO J, 2011. **30**(1): p. 57-67.
528. Pfeffer, L.M., *The role of nuclear factor kappaB in the interferon response*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(7): p. 553-9.
529. Wei, L., et al., *Bioinformatic analysis reveals cRel as a regulator of a subset of interferon-stimulated genes*. J Interferon Cytokine Res, 2008. **28**(9): p. 541-51.
530. Pfeffer, L.M., et al., *Role of nuclear factor-kappaB in the antiviral action of interferon and interferon-regulated gene expression*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31304-11.

531. Cheng, C.S., et al., *The specificity of innate immune responses is enforced by repression of interferon response elements by NF-kappaB p50*. Sci Signal, 2011. **4**(161): p. ra11.
532. Fish, E.N. and L.C. Platanias, *Interferon receptor signaling in malignancy: a network of cellular pathways defining biological outcomes*. Mol Cancer Res, 2014. **12**(12): p. 1691-703.
533. Brisac, C., et al., *IQGAP2 is a novel interferon-alpha antiviral effector gene acting non-conventionally through the NF-kappaB pathway*. J Hepatol, 2016. **65**(5): p. 972-979.
534. Kimelman, D. and W. Xu, *beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective*. Oncogene, 2006. **25**(57): p. 7482-91.
535. Miller, J.R., et al., *Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca2+ pathways*. Oncogene, 1999. **18**(55): p. 7860-72.
536. Anastas, J.N. and R.T. Moon, *WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(1): p. 11-26.
537. Major, M.B., et al., *Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling*. Science, 2007. **316**(5827): p. 1043-6.
538. Trost, M., et al., *The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 143-54.
539. Trost, M., et al., *Posttranslational regulation of self-renewal capacity: insights from proteome and phosphoproteome analyses of stem cell leukemia*. Blood, 2012. **120**(8): p. e17-27.
540. Mostafavi, S., et al., *GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function*. Genome Biol, 2008. **9 Suppl 1**: p. S4.
541. Chatr-Aryamontri, A., et al., *The BioGRID interaction database: 2015 update*. Nucleic Acids Res, 2014.
542. Tago, K., et al., *Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein*. Genes Dev, 2000. **14**(14): p. 1741-9.
543. Kawajiri, K., et al., *Aryl hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13481-6.
544. Choi, J.D., et al., *FIP200 inhibits beta-catenin-mediated transcription by promoting APC-independent beta-catenin ubiquitination*. Oncogene, 2013. **32**(19): p. 2421-32.
545. Sousa, S., et al., *ARHGAP10 is necessary for alpha-catenin recruitment at adherens junctions and for Listeria invasion*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(10): p. 954-60.
546. Briggs, M.W., Z. Li, and D.B. Sacks, *IQGAP1-mediated stimulation of transcriptional co-activation by beta-catenin is modulated by calmodulin*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7453-65.
547. Bauer, A., et al., *Pontin52 and reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity*. EMBO J, 2000. **19**(22): p. 6121-30.
548. Yakulov, T., et al., *Wnt3a-dependent and -independent protein interaction networks of chromatin-bound beta-catenin in mouse embryonic stem cells*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(7): p. 1980-94.

549. Enchev, R.I., B.A. Schulman, and M. Peter, *Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(1): p. 30-44.
550. Nawrocki, S.T., et al., *MLN4924: a novel first-in-class inhibitor of NEDD8-activating enzyme for cancer therapy*. Expert Opin Investig Drugs, 2012. **21**(10): p. 1563-73.
551. Baril, M., et al., *Genome-wide RNAi screen reveals a new role of a WNT/CTNNB1 signaling pathway as negative regulator of virus-induced innate immune responses*. PLoS Pathog, 2013. **9**(6): p. e1003416.
552. Kang, X., et al., *DDB1 is a cellular substrate of NS3/4A protease and required for hepatitis C virus replication*. Virology, 2013. **435**(2): p. 385-94.
553. Minor, M.M. and B.L. Slagle, *Hepatitis B virus HBx protein interactions with the ubiquitin proteasome system*. Viruses, 2014. **6**(11): p. 4683-702.
554. Laguette, N., et al., *Premature activation of the SLX4 complex by Vpr promotes G2/M arrest and escape from innate immune sensing*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 134-45.
555. Precious, B., et al., *Simian virus 5 V protein acts as an adaptor, linking DDB1 to STAT2, to facilitate the ubiquitination of STAT1*. J Virol, 2005. **79**(21): p. 13434-41.
556. Bortz, E., et al., *Host- and strain-specific regulation of influenza virus polymerase activity by interacting cellular proteins*. MBio, 2011. **2**(4).
557. Kuroda, S., et al., *Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin- mediated cell-cell adhesion*. Science, 1998. **281**(5378): p. 832-5.
558. Ewing, R.M., et al., *Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry*. Mol Syst Biol, 2007. **3**: p. 89.
559. Meijer, L., et al., *GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins*. Chem Biol, 2003. **10**(12): p. 1255-66.
560. Rousseau, B., et al., *Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2007. **46**(4): p. 1108-18.
561. Jeronimo, C., et al., *Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme*. Mol Cell, 2007. **27**(2): p. 262-74.
562. Hadjihannas, M.V., M. Bruckner, and J. Behrens, *Conductin/axin2 and Wnt signalling regulates centrosome cohesion*. EMBO Rep, 2010. **11**(4): p. 317-24.
563. Huang, P., T. Senga, and M. Hamaguchi, *A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome*. Oncogene, 2007. **26**(30): p. 4357-71.
564. Faux, M.C., et al., *Independent interactions of phosphorylated beta-catenin with E-cadherin at cell-cell contacts and APC at cell protrusions*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e14127.
565. Chilov, D., et al., *Phosphorylated beta-catenin localizes to centrosomes of neuronal progenitors and is required for cell polarity and neurogenesis in developing midbrain*. Dev Biol, 2011. **357**(1): p. 259-68.
566. Tapia, M., et al., *GSK3 and beta-catenin determines functional expression of sodium channels at the axon initial segment*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(1): p. 105-20.

567. Yuan, J., et al., *CUL4B activates Wnt/beta-catenin signalling in hepatocellular carcinoma by repressing Wnt antagonists*. J Pathol, 2015. **235**(5): p. 784-95.
568. Song, B., et al., *Knockdown of CUL4B inhibits proliferation and promotes apoptosis of colorectal cancer cells through suppressing the Wnt/beta-catenin signaling pathway*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(9): p. 10394-402.
569. Kronke, J., et al., *Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of CK1alpha in del(5q) MDS*. Nature, 2015. **523**(7559): p. 183-8.
570. Li, Q., et al., *Akt Phosphorylates Wnt Coactivator and Chromatin Effector Pygo2 at Serine 48 to Antagonize Its Ubiquitin/Proteasome-mediated Degradation*. J Biol Chem, 2015. **290**(35): p. 21553-67.
571. Karner, C.M., et al., *Canonical Wnt9b signaling balances progenitor cell expansion and differentiation during kidney development*. Development, 2011. **138**(7): p. 1247-57.
572. Preziosi, M., et al., *Endothelial Wnts regulate beta-catenin signaling in murine liver zonation and regeneration: A sequel to the Wnt-Wnt situation*. Hepatol Commun, 2018. **2**(7): p. 845-860.
573. Pan, X., C.M. Karner, and T.J. Carroll, *Myc cooperates with beta-catenin to drive gene expression in nephron progenitor cells*. Development, 2017. **144**(22): p. 4173-4182.
574. Cho, S.H. and C.L. Cepko, *Wnt2b/beta-catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye*. Development, 2006. **133**(16): p. 3167-77.
575. Valenta, T., et al., *Wnt Ligands Secreted by Subepithelial Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis*. Cell Rep, 2016. **15**(5): p. 911-918.
576. Goddard, L.M., et al., *Hemodynamic Forces Sculpt Developing Heart Valves through a KLF2-WNT9B Paracrine Signaling Axis*. Dev Cell, 2017. **43**(3): p. 274-289 e5.
577. Ramalingam, H., et al., *Disparate levels of beta-catenin activity determine nephron progenitor cell fate*. Dev Biol, 2018. **440**(1): p. 13-21.
578. Poulain, M. and E.A. Ober, *Interplay between Wnt2 and Wnt2bb controls multiple steps of early foregut-derived organ development*. Development, 2011. **138**(16): p. 3557-68.
579. Ober, E.A., et al., *Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification*. Nature, 2006. **442**(7103): p. 688-91.
580. Yuan, Y., et al., *Wnt2b attenuates HSCs activation and liver fibrosis through negative regulating TLR4 signaling*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 3952.
581. Chandrakesan, P., et al., *Differential effects of beta-catenin and NF-kappaB interplay in the regulation of cell proliferation, inflammation and tumorigenesis in response to bacterial infection*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79432.
582. Gatica-Andrades, M., et al., *WNT ligands contribute to the immune response during septic shock and amplify endotoxemia-driven inflammation in mice*. Blood Adv, 2017. **1**(16): p. 1274-1286.

583. Schaale, K., et al., *Wnt6 is expressed in granulomatous lesions of Mycobacterium tuberculosis-infected mice and is involved in macrophage differentiation and proliferation*. J Immunol, 2013. **191**(10): p. 5182-95.
584. Bansal, K., et al., *Pathogen-specific TLR2 protein activation programs macrophages to induce Wnt-beta-catenin signaling*. J Biol Chem, 2011. **286**(42): p. 37032-44.
585. Katoh, M. and M. Katoh, *Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF-kappaB, Hedgehog, TGFbeta, and Notch signaling cascades*. Int J Mol Med, 2009. **23**(6): p. 763-9.
586. McCall, K.D., et al., *High basal levels of functional toll-like receptor 3 (TLR3) and noncanonical Wnt5a are expressed in papillary thyroid cancer and are coordinately decreased by phenylmethimazole together with cell proliferation and migration*. Endocrinology, 2007. **148**(9): p. 4226-37.
587. Li, Y., et al., *A Wnt/beta-catenin negative feedback loop represses TLR-triggered inflammatory responses in alveolar epithelial cells*. Mol Immunol, 2014. **59**(2): p. 128-35.
588. Beurel, E. and R.S. Jope, *Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain*. J Neuroinflammation, 2009. **6**: p. 9.
589. Nahman, S., R.H. Belmaker, and A.N. Azab, *Effects of lithium on lipopolysaccharide-induced inflammation in rat primary glia cells*. Innate Immun, 2012. **18**(3): p. 447-58.
590. Chen, K., et al., *Lithium chloride promotes host resistance against Pseudomonas aeruginosa keratitis*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 1502-14.
591. Stamos, J.L., et al., *Structural basis of GSK-3 inhibition by N-terminal phosphorylation and by the Wnt receptor LRP6*. Elife, 2014. **3**: p. e01998.
592. Schwabe, R.F. and D.A. Brenner, *Role of glycogen synthase kinase-3 in TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and apoptosis in hepatocytes*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(1): p. G204-11.
593. Dugo, L., M. Collin, and C. Thiemermann, *Glycogen synthase kinase 3beta as a target for the therapy of shock and inflammation*. Shock, 2007. **27**(2): p. 113-23.
594. Ko, R. and S.Y. Lee, *Glycogen synthase kinase 3beta in Toll-like receptor signaling*. BMB Rep, 2016. **49**(6): p. 305-10.
595. Wang, H., et al., *GSK3beta and the control of infectious bacterial diseases*. Trends Microbiol, 2014. **22**(4): p. 208-17.
596. Qin, D., et al., *Activation of PI3K/AKT and ERK MAPK signal pathways is required for the induction of lytic cycle replication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by herpes simplex virus type 1*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 240.
597. Gui, B., et al., *Neuroprotective effects of pretreatment with propofol in LPS-induced BV-2 microglia cells: role of TLR4 and GSK-3beta*. Inflammation, 2012. **35**(5): p. 1632-40.
598. Fallah, M.P., et al., *Role of phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway in the age-related cytokine dysregulation in splenic macrophages stimulated via TLR-2 or TLR-4 receptors*. Mech Ageing Dev, 2011. **132**(6-7): p. 274-86.

599. Li, J.D., *Exploitation of host epithelial signaling networks by respiratory bacterial pathogens*. J Pharmacol Sci, 2003. **91**(1): p. 1-7.
600. Choi, Y.S., J. Hur, and S. Jeong, *Beta-catenin binds to the downstream region and regulates the expression C-reactive protein gene*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(16): p. 5511-9.
601. Schwitalla, S., et al., *Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties*. Cell, 2013. **152**(1-2): p. 25-38.
602. Cho, I.R., et al., *SIRT1 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells expressing pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF), a novel oncogene, by suppression of beta-catenin*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **423**(2): p. 270-5.
603. Iaconelli, J., et al., *HDAC6 inhibitors modulate Lys49 acetylation and membrane localization of beta-catenin in human iPSC-derived neuronal cells*. ACS Chem Biol, 2015. **10**(3): p. 883-90.
604. Watanabe, K., et al., *Integrative ChIP-seq/microarray analysis identifies a CTNNB1 target signature enriched in intestinal stem cells and colon cancer*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e92317.
605. Jackson, S. and Y. Xiong, *CRL4s: the CUL4-RING E3 ubiquitin ligases*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(11): p. 562-70.
606. Petzold, G., E.S. Fischer, and N.H. Thoma, *Structural basis of lenalidomide-induced CK1alpha degradation by the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase*. Nature, 2016. **532**(7597): p. 127-30.
607. He, Y.J., et al., *DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases*. Genes Dev, 2006. **20**(21): p. 2949-54.
608. Katiyar, S., et al., *REDD1, an inhibitor of mTOR signalling, is regulated by the CUL4A-DDB1 ubiquitin ligase*. EMBO Rep, 2009. **10**(8): p. 866-72.
609. Goto, T., et al., *WDR26 is a new partner of Axin1 in the canonical Wnt signaling pathway*. FEBS Lett, 2016. **590**(9): p. 1291-303.
610. Melchor, L., et al., *Comprehensive characterization of the DNA amplification at 13q34 in human breast cancer reveals TFDP1 and CUL4A as likely candidate target genes*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(6): p. R86.
611. Ren, S., et al., *Oncogenic CUL4A determines the response to thalidomide treatment in prostate cancer*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(10): p. 1121-32.
612. Wang, Y., et al., *CUL4A overexpression enhances lung tumor growth and sensitizes lung cancer cells to erlotinib via transcriptional regulation of EGFR*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 252.
613. Sui, X., et al., *CUL4A promotes proliferation and metastasis of colorectal cancer cells by regulating H3K4 trimethylation in epithelial-mesenchymal transition*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 735-743.
614. Wang, Y., et al., *CUL4A induces epithelial-mesenchymal transition and promotes cancer metastasis by regulating ZEB1 expression*. Cancer Res, 2014. **74**(2): p. 520-31.

615. Jiang, T., et al., *Cullin 4B is a novel prognostic marker that correlates with colon cancer progression and pathogenesis*. Med Oncol, 2013. **30**(2): p. 534.
616. Gajewski, T.F., H. Schreiber, and Y.X. Fu, *Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 1014-22.
617. Corrales, L., et al., *Innate immune signaling and regulation in cancer immunotherapy*. Cell Res, 2017. **27**(1): p. 96-108.
618. Rother, S., et al., *NF-kappaB-repressing factor phosphorylation regulates transcription elongation via its interactions with 5'-->3' exoribonuclease 2 and negative elongation factor*. FASEB J, 2016. **30**(1): p. 174-85.
619. Dreikhausen, U., et al., *NF-kappaB-repressing factor inhibits elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcription by DRB sensitivity-inducing factor*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7473-83.
620. Kwak, H. and J.T. Lis, *Control of transcriptional elongation*. Annu Rev Genet, 2013. **47**: p. 483-508.
621. Bentley, D.L., *Coupling mRNA processing with transcription in time and space*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(3): p. 163-75.
622. Ainbinder, E., et al., *Elongation inhibition by DRB sensitivity-inducing factor is regulated by the A20 promoter via a novel negative element and NF-kappaB*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(6): p. 2444-54.
623. Adelman, K. and J.T. Lis, *Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(10): p. 720-31.
624. Huang, K.H., et al., *NF-kappaB repressing factor inhibits chemokine synthesis by peripheral blood mononuclear cells and alveolar macrophages in active pulmonary tuberculosis*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e77789.
625. Brandenburg, J. and N. Reiling, *The Wnt Blows: On the Functional Role of Wnt Signaling in Mycobacterium tuberculosis Infection and Beyond*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 635.
626. Villasenor, T., et al., *Activation of the Wnt Pathway by Mycobacterium tuberculosis: A Wnt-Wnt Situation*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 50.
627. Fu, Y., et al., *Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(12): p. 4246-51.
628. Lee, K.Y., et al., *Reduced nuclear factor-kappaB repressing factor: a link toward systemic inflammation in COPD*. Eur Respir J, 2012. **40**(4): p. 863-73.
629. Kneidinger, N., et al., *Activation of the WNT/beta-catenin pathway attenuates experimental emphysema*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(6): p. 723-33.
630. Guo, L., et al., *WNT/beta-catenin signaling regulates cigarette smoke-induced airway inflammation via the PPARdelta/p38 pathway*. Lab Invest, 2016. **96**(2): p. 218-29.
631. Cui, C., et al., *Is beta-Catenin a Druggable Target for Cancer Therapy?* Trends Biochem Sci, 2018. **43**(8): p. 623-634.
632. Hwang, S.Y., et al., *Direct Targeting of beta-Catenin by a Small Molecule Stimulates Proteasomal Degradation and Suppresses Oncogenic Wnt/beta-Catenin Signaling*. Cell Rep, 2016. **16**(1): p. 28-36.

633. Filley, A.C. and M. Dey, *Immune System, Friend or Foe of Oncolytic Virotherapy?* Front Oncol, 2017. **7**: p. 106.

Annexe 1 : tableaux supplémentaires des résultats de la spectrométrie de masse (VS)

Interactome de la CTNNB1 . Liste des 592 protéines interagissant avec la CTNNB1 à partir de la MS-MS de manière reproductible et avec au moins deux peptides .

IPI ID	Protein name and description	Number of peptides
IPI00017292	CTNNB1 Isoform 1 of Catenin beta-1	178
IPI00012391	APC Isoform Long of Adenomatous polyposis coli protein	159
IPI00019359	KRT9 Keratin type I cytoskeletal 9	123
IPI00220327	KRT1 Keratin type II cytoskeletal 1	113
IPI00441473	PRMT5 Protein arginine N-methyltransferase 5	99
IPI00009865	KRT10 Keratin type I cytoskeletal 10	93
IPI00215948	CTNNA1 Isoform 1 of Catenin alpha-1	86
IPI00022542	ROCK1 Rho-associated protein kinase 1	83
IPI00021304	KRT2 Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal	77
IPI00012079	EIF4B Eukaryotic translation initiation factor 4B	76
IPI00009867	KRT5 Keratin type II cytoskeletal 5	61
IPI00300725	KRT6A Keratin type II cytoskeletal 6A	58
IPI00217963	KRT16 Keratin type I cytoskeletal 16	56
IPI00299145	KRT6C Keratin type II cytoskeletal 6C	56
IPI00026089	SF3B1 Splicing factor 3B subunit 1	56
IPI01008793	RBM10 RNA-binding protein 10 isoform 5	55
IPI00328230	SPTBN1 Isoform Short of Spectrin beta chain brain 1	55
IPI00796776	KRT5 cDNA FLJ54081 highly similar to Keratin type II cytoskeletal 5	54
IPI00293665	KRT6B Keratin type II cytoskeletal 6B	54
IPI00029012	EIF3A Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	53
IPI00007928	PRPF8 Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	53
IPI00384444	KRT14 Keratin type I cytoskeletal 14	52
IPI00604620	NCL Nucleolin	51
IPI00745872	ALB Isoform 1 of Serum albumin	50
IPI00022434	ALB Uncharacterized protein	49
IPI00006079	BCLAF1 Isoform 1 of Bcl-2-associated transcription factor 1	49
IPI00942246	AMPD2 Isoform Ex1B-2-3 of AMP deaminase 2	49
IPI00413672	BCLAF1 Isoform 3 of Bcl-2-associated transcription factor 1	47
IPI00782992	SRRM2 Isoform 1 of Serine/arginine repetitive matrix protein 2	47
IPI00171903	HNRNPM Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	46
IPI00302592	FLNA Isoform 2 of Filamin-A	45
IPI00300371	SF3B3 Isoform 1 of Splicing factor 3B subunit 3	44
IPI00910738	KRT6B cDNA FLJ60647 highly similar to Keratin type II cytoskeletal 6B	44
IPI00843765	SPTAN1 Isoform 3 of Spectrin alpha chain brain	44
IPI00104050	THRAP3 Thyroid hormone receptor-associated protein 3	43
IPI00420014	SNRNP200 Isoform 1 of U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	42
IPI00003865	HSPA8 Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein	40
IPI00221106	SF3B2 Splicing factor 3B subunit 2	39
IPI00171336	RIOK1 Serine/threonine-protein kinase RIO1	39
IPI00008524	PABPC1 Isoform 1 of Polyadenylate-binding protein 1	39
IPI00796945	PABPC1 cDNA FLJ37875 fis clone BRSSN2018771 highly similar to Poly(A)-binding protein	38
IPI00789324	JUP Uncharacterized protein	37
IPI00450768	KRT17 Keratin type I cytoskeletal 17	36

IPI00003918	RPL4 60S ribosomal protein L4	36
IPI00014264	ACAP2 Arf-GAP with coiled-coil ANK repeat and PH domain-containing protein 2	36
IPI00305267	GOLGA3 Isoform 1 of Golgin subfamily A member 3	35
IPI00479217	HNRNPU Isoform Short of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	32
IPI00013933	DSP Isoform DPI of Desmoplakin	32
IPI00012202	WDR77 Methylosome protein 50	32
IPI00031812	YBX1 Nuclease-sensitive element-binding protein 1	31
IPI00218130	PYGM Glycogen phosphorylase muscle form	30
IPI00219866	ZRANB2 Isoform 2 of Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	30
IPI00554711	JUP Junction plakoglobin	30
IPI00549248	NPM1 Isoform 1 of Nucleophosmin	29
IPI00396370	EIF3B Isoform 1 of Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	29
IPI00143753	U2SURP Isoform 1 of U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	29
IPI00003519	EFTUD2 116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	29
IPI00216049	HNRNPK Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	28
IPI00966302	U2SURP Uncharacterized protein	28
IPI00642971	EEF1D Isoform 2 of Elongation factor 1-delta	27
IPI00015953	DDX21 Isoform 1 of Nucleolar RNA helicase 2	27
IPI00004968	PRPF19 Pre-mRNA-processing factor 19	27
IPI00396485	EEF1A1 Elongation factor 1-alpha 1	27
IPI00706094	CSN1S1 Alpha-S1-casein precursor	27
IPI01025520	PRMT5 20 kDa protein	26
IPI00000875	EEF1G cDNA FLJ56389 highly similar to Elongation factor 1-gamma	26
IPI00003362	HSPA5 78 kDa glucose-regulated protein	25
IPI00739940	FRYL Isoform 1 of Protein furry homolog-like	25
IPI00398625	HRNR Hornerin	25
IPI00027251	STK38 Serine/threonine-protein kinase 38	25
IPI00027834	HNRNPL Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	24
IPI01009986	EEF1D Uncharacterized protein	24
IPI00647794	WDR77 WD repeat domain 77	24
IPI00296337	PRKDC Isoform 1 of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	24
IPI00790342	RPL6 60S ribosomal protein L6	23
IPI00185919	LARP1 Isoform 1 of La-related protein 1	23
IPI00984346	- Conserved hypothetical protein	23
IPI00024466	UGGT1 Isoform 1 of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	23
IPI00011253	RPS3 40S ribosomal protein S3	22
IPI00217030	RPS4X 40S ribosomal protein S4 X isoform	22
IPI00013788	HTATSF1 HIV Tat-specific factor 1	22
IPI00743859	CTNNA2 Isoform 2 of Catenin alpha-2	21
IPI01012991	LUC7L2 Isoform 1 of Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	21
IPI00698843	CSN1S2 Alpha-S2-casein precursor	21
IPI00021439	ACTB Actin cytoplasmic 1	21
IPI00465370	RNF219 RING finger protein 219	21
IPI01008748	LUC7L2 Isoform 2 of Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	20
IPI00697085	CSN2 Beta-casein precursor	20
IPI00555747	PABPC4 Isoform 2 of Polyadenylate-binding protein 4	20
IPI00651653	DDX17 probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 isoform 3	20
IPI00005859	KRT75 Keratin type II cytoskeletal 75	19
IPI00376379	KRT77 Keratin type II cytoskeletal 1b	19
IPI00301154	PABPC3 Polyadenylate-binding protein 3	19
IPI00930688	TUBA1B Tubulin alpha-1B chain	19
IPI00307259	DNAJC13 DnaJ homolog subfamily C member 13	19
IPI01015522	ACTB cDNA FLJ55253 highly similar to Actin cytoplasmic 1	19
IPI01019113	TUBB Tubulin beta chain	19
IPI00465361	RPL13 60S ribosomal protein L13	18
IPI00013214	MCM3 cDNA FLJ55599 highly similar to DNA replication licensing factor MCM3	18

IPI00013214	MCM3 cDNA FLJ55599 highly similar to DNA replication licensing factor MCM3	18
IPI00008530	RPLP0 60S acidic ribosomal protein P0	18
IPI00013485	RPS2 40S ribosomal protein S2	18
IPI00026612	PPM1B Isoform Beta-1 of Protein phosphatase 1B	18
IPI00186290	EEF2 Elongation factor 2	18
IPI00026320	UBR5 E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	18
IPI00470497	SERBP1 Isoform 2 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	18
IPI00008529	RPLP2 60S acidic ribosomal protein P2	18
IPI00292000	PRPF31 Isoform 1 of U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	17
IPI00555744	RPL14 Ribosomal protein L14 variant	17
IPI00021840	RPS6 40S ribosomal protein S6	17
IPI00008359	KRT76 Keratin type II cytoskeletal 2 oral	17
IPI00024933	RPL12 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L12	17
IPI00479262	EIF4G1 eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 isoform 1	17
IPI00016801	GLUD1 Glutamate dehydrogenase 1 mitochondrial	17
IPI00290857	KRT3 Keratin type II cytoskeletal 3	16
IPI00008240	MARS Methionyl-tRNA synthetase cytoplasmic	16
IPI00017617	DDX5 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	16
IPI00005675	NKRF NF-kappa-B-repressing factor	16
IPI00412579	RPL10A 60S ribosomal protein L10a	16
IPI00396435	DHX15 Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	16
IPI00550655	SPIN1 Spindlin-1	16
IPI00025753	DSG1 Desmoglein-1	16
IPI00004358	PYGB Glycogen phosphorylase brain form	15
IPI00182533	RPL28 60S ribosomal protein L28	15
IPI00017451	SF3A1 Splicing factor 3A subunit 1	15
IPI00008433	RPS5 40S ribosomal protein S5	15
IPI00007702	HSPA2 Heat shock-related 70 kDa protein 2	15
IPI00305068	PRPF6 Pre-mRNA-processing factor 6	15
IPI00215637	DDX3X ATP-dependent RNA helicase DDX3X	15
IPI00010700	PRRC2A Isoform 1 of Protein PRRC2A	15
IPI00465233	EIF3L Uncharacterized protein	15
IPI00169307	ARHGAP21 rho GTPase-activating protein 21	15
IPI00465294	CDC5L Cell division cycle 5-like protein	15
IPI00019459	TAB1 TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1	15
IPI00004795	CLNS1A Methylosome subunit pICln	15
IPI00028931	DSG2 Desmoglein-2	14
IPI00012772	RPL8 60S ribosomal protein L8	14
IPI00241841	KRT79 Keratin type II cytoskeletal 79	14
IPI00013881	HNRNPH1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	14
IPI00743802	PPM1B Isoform Beta-2 of Protein phosphatase 1B	14
IPI00031691	RPL9 60S ribosomal protein L9	14
IPI00007750	TUBA4A Tubulin alpha-4A chain	14
IPI00159899	ANKFY1 Isoform 1 of Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1	14
IPI00299254	EIF5B Eukaryotic translation initiation factor 5B	14
IPI00009866	KRT13 Isoform 1 of Keratin type I cytoskeletal 13	14
IPI00005024	MYBBP1A Isoform 1 of Myb-binding protein 1A	14
IPI00747002	AXIN1 Isoform 1 of Axin-1	14
IPI00472887	CKAP5 Isoform 2 of Cytoskeleton-associated protein 5	14
IPI00007752	TUBB2C Tubulin beta-2C chain	14
IPI00022774	VCP Transitional endoplasmic reticulum ATPase	14

IPI00011694	PRSS1 Trypsin-1	13
IPI00643152	HSPA1L cDNA FLJ56386 highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1L	13
IPI00293655	DDX1 ATP-dependent RNA helicase DDX1	13
IPI00553185	CCT3 T-complex protein 1 subunit gamma	13
IPI00215780	RPS19 40S ribosomal protein S19	13
IPI00844578	DHX9 ATP-dependent RNA helicase A	13
IPI00221092	RPS16 40S ribosomal protein S16	13
IPI00021428	ACTA1 Actin alpha skeletal muscle	13
IPI00013415	RPS7 40S ribosomal protein S7	13
IPI00925547	LTF Uncharacterized protein	13
IPI00012795	EIF3I Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	13
IPI00418471	VIM Vimentin	13
IPI00014319	IVNS1ABP Influenza virus NS1A-binding protein	13
IPI00018971	TRIM21 Isoform 1 of E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21	13
IPI00025091	RPS11 40S ribosomal protein S11	12
IPI00221088	RPS9 40S ribosomal protein S9	12
IPI00025329	RPL19 60S ribosomal protein L19	12
IPI00306332	RPL24 60S ribosomal protein L24	12
IPI00382516	PRMT1 protein arginine N-methyltransferase 1 isoform 3	12
IPI00382470	HSP90AA1 Isoform 2 of Heat shock protein HSP 90-alpha	12
IPI00977661	RPL17-C18ORF32 RPL17-C18orf32 protein isoform 1	12
IPI00025001	CTNNBIP1 Beta-catenin-interacting protein 1	12
IPI01013939	CTTN src substrate cortactin isoform c	12
IPI00647650	EIF3H cDNA FLJ35809 fis clone TEST12006016 highly similar to Eukaryotic translation initia	12
IPI00783392	RB1CC1 Isoform 1 of RB1-inducible coiled-coil protein 1	12
IPI00019038	LYZ Lysozyme C	12
IPI00470528	RPL15 60S ribosomal protein L15	12
IPI00642862	PPIL4 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4	12
IPI00021417	SART1 U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	12
IPI00013475	TUBB2A Tubulin beta-2A chain	12
IPI00218566	MAP3K7 Isoform 1A of Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	11
IPI00456758	RPL27A 60S ribosomal protein L27a	11
IPI00217357	CCAR1 Isoform 1 of Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	11
IPI00302925	CCT8 59 kDa protein	11
IPI00026202	RPL18A 60S ribosomal protein L18a	11
IPI01021320	RPLP0 Uncharacterized protein	11
IPI01014089	PRRC2C Isoform 3 of Protein PRRC2C	11
IPI00031801	CSDA Isoform 1 of DNA-binding protein A	11
IPI00180730	- Similar to Elongation factor 1-alpha 1	11
IPI00219018	GAPDH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	11
IPI00167391	FAM123B Isoform 1 of Protein FAM123B	11
IPI00010204	SRSF3 Serine/arginine-rich splicing factor 3	11
IPI00183572	DOCK7 Isoform 2 of Dedicator of cytokinesis protein 7	11
IPI00550689	C22orf28 tRNA-splicing ligase RtcB homolog	11
IPI00477227	KRT78 Isoform 1 of Keratin type II cytoskeletal 78	11
IPI00027146	GLUD2 Glutamate dehydrogenase 2 mitochondrial	11
IPI00290460	EIF3G Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	11
IPI00658202	CDH2 cDNA FLJ53252 highly similar to Cadherin-2	11
IPI00014230	C1QBP Complement component 1 Q subcomponent-binding protein mitochondrial	11
IPI00218606	RPS23 40S ribosomal protein S23	10

IPI00290077	KRT15 Keratin type I cytoskeletal 15	10
IPI00479145	KRT19 Keratin type I cytoskeletal 19	10
IPI00216694	PLS3 Plastin-3	10
IPI00174775	KRT73 Isoform 1 of Keratin type II cytoskeletal 73	10
IPI00329306	KRT74 Keratin type II cytoskeletal 74	10
IPI00027270	RPL26 60S ribosomal protein L26	10
IPI00008557	IGF2BP1 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	10
IPI00176706	RBM17 Splicing factor 45	10
IPI00745038	LRCH2 Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 2	10
IPI00339269	HSPA6 Heat shock 70 kDa protein 6	10
IPI00176702	CAMSAP3 Isoform 1 of Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3	10
IPI00386879	IGHA1 cDNA FLJ14473 fis clone MAMMA1001080 highly similar to Homo sapiens SNC73 p	10
IPI00306749	SLC4A1AP Kanadaplin	10
IPI00012268	PSMD2 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	10
IPI00479786	KHSRP Isoform 1 of Far upstream element-binding protein 2	10
IPI00006099	BMS1 Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	10
IPI00654777	EIF3F cDNA FLJ36192 fis clone TEST12027450 highly similar to Eukaryotic translation initia	10
IPI00220503	DCTN2 Isoform 2 of Dynactin subunit 2	10
IPI00005198	ILF2 Interleukin enhancer-binding factor 2	10
IPI00016634	C20orf11 Protein C20orf11	10
IPI00397801	FLG2 Filaggrin-2	10
IPI00479743	POTEE Isoform 1 of POTE ankyrin domain family member E	10
IPI00029628	RCN2 Reticulocalbin-2	10
IPI00169276	- Putative trypsin-6	10
IPI00221089	RPS13 40S ribosomal protein S13	9
IPI00219330	ILF3 Isoform 5 of Interleukin enhancer-binding factor 3	9
IPI00216237	RPL36 60S ribosomal protein L36	9
IPI00554648	KRT8 Keratin type II cytoskeletal 8	9
IPI00103481	KRT72 Isoform 1 of Keratin type II cytoskeletal 72	9
IPI00141318	CKAP4 Cytoskeleton-associated protein 4	9
IPI00219616	PRPS1 Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	9
IPI00414676	HSP90AB1 Heat shock protein HSP 90-beta	9
IPI00071318	LUC7L Isoform 1 of Putative RNA-binding protein Luc7-like 1	9
IPI00215719	RPL18 60S ribosomal protein L18	9
IPI00008708	RSL1D1 Ribosomal L1 domain-containing protein 1	9
IPI00182757	KIAA1967 Isoform 1 of Protein KIAA1967	9
IPI00000816	YWHAE Isoform 1 of 14-3-3 protein epsilon	9
IPI00426051	IGHG2 Putative uncharacterized protein DKFZp686C15213	9
IPI00556297	SRSF6 Arginine/serine-rich splicing factor 6 variant (Fragment)	9
IPI00414197	WDR26 Isoform 1 of WD repeat-containing protein 26	9
IPI00013068	EIF3E Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	9
IPI00010153	RPL23 60S ribosomal protein L23	9
IPI00332936	ZC3HAV1 Isoform 2 of Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	9
IPI00013885	CASP14 Caspase-14	9
IPI00333010	CHERP Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	9
IPI00396378	HNRNPA2B1 Isoform B1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	9
IPI00646961	HDX Isoform 1 of Highly divergent homeobox	9
IPI00006181	EIF3D Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	9
IPI00000874	PRDX1 Peroxiredoxin-1	8
IPI00219155	RPL27 60S ribosomal protein L27	8

IPI00479058	RPS15 40S ribosomal protein S15	8
IPI00005537	SLC25A10 cDNA FLJ60124 highly similar to Mitochondrial dicarboxylate carrier	8
IPI00010404	SF3B5 Splicing factor 3B subunit 5	8
IPI00395998	RPL32 60S ribosomal protein L32	8
IPI00784202	YBX1P2 Similar to YB-1 protein	8
IPI00061200	KRT71 Keratin type II cytoskeletal 71	8
IPI00005511	PHF5A PHD finger-like domain-containing protein 5A	8
IPI00848328	- Similar to Peroxisomal enoyl-coenzyme A hydratase-like protein	8
IPI00514908	KPRP Keratinocyte proline-rich protein	8
IPI00880007	MAP4 Microtubule-associated protein	8
IPI00927454	ACAP2 Protein	8
IPI00297779	CCT2 T-complex protein 1 subunit beta	8
IPI00012345	SRSF5 Isoform SRP55-1 of Serine/arginine-rich splicing factor 6	8
IPI00304692	RBMX Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	8
IPI00983034	PABPC1 Protein	8
IPI00307155	ROCK2 Rho-associated protein kinase 2	8
IPI00783559	EXOC2 Exocyst complex component 2	8
IPI00013452	EPRS Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	8
IPI00981193	RPS3 Uncharacterized protein	8
IPI00017963	SNRPD2 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	8
IPI00414604	E2F7 Isoform 1 of Transcription factor E2F7	8
IPI00179964	PTBP1 Isoform 1 of Polypyrimidine tract-binding protein 1	8
IPI00396321	LRRC59 Leucine-rich repeat-containing protein 59	8
IPI00006725	DDX23 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	8
IPI00030274	NSRP1 Nuclear speckle splicing regulatory protein 1	8
IPI00106955	C11orf84 Uncharacterized protein C11orf84	8
IPI00039864	RANBP10 Ran-binding protein 10	8
IPI00783271	LRPPRC Leucine-rich PPR motif-containing protein mitochondrial	8
IPI00909735	AP2B1 cDNA FLJ54516 highly similar to Adapter-related protein complex 2 beta-1 subunit	8
IPI00376798	RPL11 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11	7
IPI00013917	RPS12 40S ribosomal protein S12	7
IPI00478327	- Ribosomal protein S4 family protein	7
IPI00029750	RPS24 Isoform 1 of 40S ribosomal protein S24	7
IPI00027285	SNRPB Isoform SM-B~ of Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B~	7
IPI00216592	HNRNPC Isoform C1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	7
IPI00004511	PFKFB3 Isoform 1 of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2 6-biphosphatase 3	7
IPI00027547	DCD Dermcidin	7
IPI00219160	RPL34 60S ribosomal protein L34	7
IPI00741317	CSNK2A1 Uncharacterized protein	7
IPI00022228	HDLBP Vigilin	7
IPI00018534	HIST1H2BL Histone H2B type 1-L	7
IPI00939523	DDX46 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46 isoform CRA_a	7
IPI00029764	SF3A3 Splicing factor 3A subunit 3	7
IPI00426060	IGHA1 Putative uncharacterized protein DKFZp686J11235 (Fragment)	7
IPI00168728	IGHM FLJ00385 protein (Fragment)	7
IPI00020487	LACRT Extracellular glycoprotein lacritin	7
IPI00007188	SLC25A5 ADP/ATP translocase 2	7
IPI00009650	LCN1 Lipocalin-1	7
IPI00290439	SRPK1 cDNA FLJ58405 highly similar to Serine/threonine-protein kinase SRPK1	7
IPI00411453	AP3D1 Isoform 1 of AP-3 complex subunit delta-1	7

IPI00033516	TUBGCP3 Isoform 1 of Gamma-tubulin complex component 3	7
IPI00782985	EIF4G2 Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	7
IPI00947285	SBSN suprabasin isoform 1 precursor	7
IPI00373877	ZNF326 Isoform 1 of Zinc finger protein 326	7
IPI00027626	CCT6A T-complex protein 1 subunit zeta	7
IPI00159652	FRYL Isoform 2 of Protein furry homolog-like	7
IPI00549736	ASCC2 Isoform 1 of Activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	7
IPI00059279	EXOC4 Exocyst complex component 4	7
IPI00179330	RPS27A Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	7
IPI00465275	RANBP9 Isoform 1 of Ran-binding protein 9	7
IPI00411733	DHX30 Isoform 1 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	7
IPI00009342	IQGAP1 Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	7
IPI00297477	SNRPA1 U2 small nuclear ribonucleoprotein A~	7
IPI00465248	ENO1 Isoform alpha-enolase of Alpha-enolase	7
IPI00020729	IRS4 Insulin receptor substrate 4	7
IPI00005969	CAPZA1 F-actin-capping protein subunit alpha-1	7
IPI00790702	AP2B1 Uncharacterized protein	7
IPI00023038	PRB1 Basic salivary proline-rich protein 1	7
IPI00294891	NOP2 Isoform 1 of Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2	6
IPI00002135	TACC3 Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	6
IPI00655650	RPS26 40S ribosomal protein S26	6
IPI00759723	RARS Isoform Monomeric of Arginyl-tRNA synthetase cytoplasmic	6
IPI00008575	KHDRBS1 Isoform 1 of KH domain-containing RNA-binding signal transduction-associate	6
IPI00007765	HSPA9 Stress-70 protein mitochondrial	6
IPI00250153	YBX2 Y-box-binding protein 2	6
IPI00300052	KRT84 Keratin type II cuticular Hb4	6
IPI00022229	APOB Apolipoprotein B-100	6
IPI00029631	ERH Enhancer of rudimentary homolog	6
IPI00027717	GEMIN4 Component of gems 4	6
IPI00646917	NUDT21 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	6
IPI00012535	DNAJA1 DnaJ homolog subfamily A member 1	6
IPI00221091	RPS15A 40S ribosomal protein S15a	6
IPI00412607	RPL35 60S ribosomal protein L35	6
IPI00218414	CA2 Carbonic anhydrase 2	6
IPI00029731	RPL35A 60S ribosomal protein L35a	6
IPI00013070	HNRNPUL1 Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	6
IPI00399007	IGHG2 Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment)	6
IPI00011937	PRDX4 Peroxiredoxin-4	6
IPI00376144	LRCH1 Isoform 2 of Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protei	6
IPI00871174	MYCBP C-Myc-binding protein	6
IPI00074148	DST Uncharacterized protein	6
IPI00012750	RPS25 40S ribosomal protein S25	6
IPI00022429	ORM1 Alpha-1-acid glycoprotein 1	6
IPI00298696	TCOF1 Isoform 2 of Treacle protein	6
IPI00438229	TRIM28 Isoform 1 of Transcription intermediary factor 1-beta	6
IPI00017964	SNRPD3 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	6
IPI00107745	LUC7L3 Isoform 1 of Luc7-like protein 3	6
IPI00328103	KRT27 Keratin type I cytoskeletal 27	6
IPI00930678	SNRPD2 small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 isoform 2	6
IPI00740019	CCDC88C Isoform 1 of Protein Daple	6

IPI00003168	PRPSAP2 Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	6
IPI00029705	TUBGCP2 Gamma-tubulin complex component 2	6
IPI00216099	DSC1 Isoform 1A of Desmocollin-1	6
IPI00005904	DDX20 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20	6
IPI00976928	- Similar to Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region	6
IPI00026271	RPS14 40S ribosomal protein S14	6
IPI00025491	EIF4A1 Eukaryotic initiation factor 4A-I	6
IPI00010720	CCT5 T-complex protein 1 subunit epsilon	6
IPI00008527	RPLP1 60S acidic ribosomal protein P1	6
IPI00328715	MTDH Protein LYRIC	6
IPI00419373	HNRNPA3 Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	6
IPI00552432	PRB2 Basic salivary proline-rich protein 2	6
IPI00017339	SF3B4 Splicing factor 3B subunit 4	6
IPI00220871	RPL37 60S ribosomal protein L37	5
IPI01012111	- Similar to 60S ribosomal protein L29	5
IPI00020771	MAP7 Isoform 3 of Ensconsin	5
IPI00032325	CSTA Cystatin-A	5
IPI00306959	KRT7 Keratin type II cytoskeletal 7	5
IPI00026256	FLG Filaggrin	5
IPI00217465	HIST1H1C Histone H1.2	5
IPI00878236	FSIP2 fibrous sheath-interacting protein 2	5
IPI00027831	GRWD1 Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1	5
IPI00940685	SNRNP40 U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein	5
IPI00328319	RBBP4 Isoform 1 of Histone-binding protein RBBP4	5
IPI00021187	RUVBL1 Isoform 1 of RuvB-like 1	5
IPI00026230	HNRNPH2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	5
IPI00643000	PRPS1 Uncharacterized protein	5
IPI00302927	CCT4 T-complex protein 1 subunit delta	5
IPI00973279	PCNT Isoform 2 of Pericentrin	5
IPI00290566	TCP1 T-complex protein 1 subunit alpha	5
IPI00783313	PYGL Glycogen phosphorylase liver form	5
IPI01019129	HDLBP cDNA FLJ55700 moderately similar to Vigilin	5
IPI00658000	IGF2BP3 Isoform 1 of Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	5
IPI00021435	PSMC2 26S protease regulatory subunit 7	5
IPI00216298	TXN Thioredoxin	5
IPI00031556	U2AF2 Isoform 1 of Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	5
IPI00465363	HIST1H2BA Histone H2B type 1-A	5
IPI00217013	SMEK1 Isoform 1 of Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	5
IPI00004573	PIGR Polymeric immunoglobulin receptor	5
IPI00161600	C17orf79 Cooperator of PRMT5	5
IPI00299608	PSMD1 Isoform 1 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	5
IPI00008438	RPS10 40S ribosomal protein S10	5
IPI00032541	KRT85 Keratin type II cuticular Hb5	5
IPI00018465	CCT7 T-complex protein 1 subunit eta	5
IPI00304187	RBM28 RNA-binding protein 28	5
IPI00399254	OTUD4 Isoform 1 of OTU domain-containing protein 4	5
IPI00940245	IGHA2 Immunoglobulin heavy chain variant (Fragment)	5
IPI00007047	S100A8 Protein S100-A8	5
IPI00000015	SRSF4 Serine/arginine-rich splicing factor 4	5
IPI00290078	KRT4 cDNA FLJ58275 highly similar to Keratin type II cytoskeletal 4	5

IPI00020416	TPP2 Tripeptidyl-peptidase 2	5
IPI00302850	SNRPD1 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	5
IPI00221325	RANBP2 E3 SUMO-protein ligase RanBP2	5
IPI00012074	HNRNPR Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	5
IPI00018140	SYNCRIP Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	5
IPI01009785	EPRS Uncharacterized protein	5
IPI00556259	PABPC1L Polyadenylate-binding protein 1-like	5
IPI00027462	S100A9 Protein S100-A9	5
IPI00916572	RPL31 Protein	5
IPI00026302	RPL31 60S ribosomal protein L31	5
IPI00966213	LUC7L3 cDNA FLJ59548 highly similar to Cisplatin resistance-associated overexpressed pr	5
IPI00005613	U2AF1 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	5
IPI00026126	SCGB2A1 Mammaglobin-B	5
IPI00033561	RNPS1 Isoform 1 of RNA-binding protein with serine-rich domain 1	5
IPI00335168	MYL6 Isoform Non-muscle of Myosin light polypeptide 6	5
IPI00215743	RRBP1 Isoform 3 of Ribosome-binding protein 1	5
IPI00007927	SMC2 Isoform 1 of Structural maintenance of chromosomes protein 2	5
IPI00022974	PIP Prolactin-inducible protein	5
IPI00032184	FAM149B1 Isoform 1 of Protein FAM149B1	5
IPI00915820	- Anti-folate binding protein (Fragment)	5
IPI00028570	GSK3B Isoform 1 of Glycogen synthase kinase-3 beta	5
IPI00009328	EIF4A3 Eukaryotic initiation factor 4A-III	5
IPI00375911	KRT25 Keratin type I cytoskeletal 25	5
IPI00328298	SMC4 Isoform 2 of Structural maintenance of chromosomes protein 4	5
IPI00009104	RUVBL2 RuvB-like 2	5
IPI00166729	AZGP1 Zinc-alpha-2-glycoprotein	5
IPI00719622	RPS28 40S ribosomal protein S28	5
IPI00004671	GOLGB1 Golgin subfamily B member 1	5
IPI00300990	CHTOP Isoform 1 of Chromatin target of PRMT1 protein	5
IPI00337602	ZNF326 cDNA FLJ50345 highly similar to Zinc finger protein 326	5
IPI00030320	DDX6 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	5
IPI00029266	SNRPE Small nuclear ribonucleoprotein E	5
IPI00032374	RRP1B Isoform 2 of Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	5
IPI00549813	PRMT8 Isoform 1 of Protein arginine N-methyltransferase 8	4
IPI00217466	HIST1H1D Histone H1.3	4
IPI00043201	CENPJ Centromere protein J	4
IPI00180956	- Uncharacterized protein	4
IPI00386758	NEFH Isoform 2 of Neurofilament heavy polypeptide	4
IPI00478966	PFKFB3 Uncharacterized protein	4
IPI00030275	TRAP1 Heat shock protein 75 kDa mitochondrial	4
IPI00003881	HNRNPF Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	4
IPI00022790	MFAP1 Microfibrillar-associated protein 1	4
IPI00003515	TRIP11 Thyroid receptor-interacting protein 11	4
IPI00218474	ENO3 Isoform 1 of Beta-enolase	4
IPI00216171	ENO2 Gamma-enolase	4
IPI00925437	PSMD2 Protein	4
IPI00844323	PRRC2B Isoform 5 of Protein PRRC2B	4
IPI00021924	H1FX Histone H1x	4
IPI00719047	- Putative uncharacterized protein	4
IPI00220624	AKAP9 A-kinase anchor protein 9 isoform 2	4

IPI00023461	MLLT4 Isoform 4 of Afadin	4
IPI00909466	HNRNPL cDNA FLJ55127 highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	4
IPI00293464	DDB1 DNA damage-binding protein 1	4
IPI00182655	KRT86 Keratin type II cuticular Hb6	4
IPI00219352	CBS Isoform 1 of Cystathionine beta-synthase	4
IPI00018146	YWHAQ 14-3-3 protein theta	4
IPI00220642	YWHAG 14-3-3 protein gamma	4
IPI00021263	YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta	4
IPI00006103	CD2BP2 CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2	4
IPI00016572	SNRPG Small nuclear ribonucleoprotein G	4
IPI00921414	- Chaperonin Cpn60/TCP-1 family protein	4
IPI00012500	BRIP1 Isoform 1 of Fanconi anemia group J protein	4
IPI00018278	H2AFV Histone H2A.V	4
IPI00237011	STK38L Serine/threonine-protein kinase 38-like	4
IPI00305477	CST1 Cystatin-SN	4
IPI00922194	CDK16 cDNA FLJ56198 highly similar to Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-1	4
IPI00031554	DDX50 ATP-dependent RNA helicase DDX50	4
IPI00002624	PLRG1 Isoform 1 of Pleiotropic regulator 1	4
IPI00003566	HOMER1 Isoform 1 of Homer protein homolog 1	4
IPI00735540	LOC440563 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like	4
IPI00027569	HNRNPCL1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1	4
IPI00021290	ACLY ATP-citrate synthase	4
IPI00217437	TTBK2 Uncharacterized protein	4
IPI00847956	- Similar to 40S ribosomal protein S27	4
IPI00010368	KIF2A Uncharacterized protein	4
IPI00100151	XRN2 Isoform 1 of 5'-3' exoribonuclease 2	4
IPI01021686	MARS 24 kDa protein	4
IPI00015905	EXOSC2 Exosome complex component RRP4	4
IPI00738655	POTEJ POTE ankyrin domain family member J	4
IPI00061178	RBMXL1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G-like 1	4
IPI00328293	SRRM1 cDNA FLJ61739 highly similar to Serine/arginine repetitive matrix protein 1	4
IPI00015838	LYAR Cell growth-regulating nucleolar protein	4
IPI00979880	KIAA1967 Protein	4
IPI00004273	RBM25 Isoform 1 of RNA-binding protein 25	4
IPI00021129	AP3B1 Isoform 1 of AP-3 complex subunit beta-1	4
IPI00953461	LARP4B La-related protein 4B	4
IPI00798155	RPS27A Pseudogene candidate	4
IPI00550247	RPL35 Protein	4
IPI00218236	PPP1CB Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	4
IPI00005705	PPP1CC Isoform Gamma-1 of Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic	4
IPI00152510	DDX54 Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase DDX54	4
IPI00292496	TUBB8 Tubulin beta-8 chain	4
IPI00014456	STRN Isoform 1 of Striatin	4
IPI00385001	NUP188 Isoform 2 of Nucleoporin NUP188 homolog	4
IPI00329583	SPATA5 Isoform 1 of Spermatogenesis-associated protein 5	4
IPI00031523	HSP90AA2 Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2	4
IPI01022801	HNRNPA1 Uncharacterized protein	4
IPI00102069	EIF3M Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	4
IPI00296161	IL1RL1 Isoform A of Interleukin-1 receptor-like 1	4
IPI00007401	IPO8 Importin-8	4

IPI00018233	SPDEF SAM pointed domain-containing Ets transcription factor	4
IPI00013774	HDAC1 Histone deacetylase 1	4
IPI00289601	HDAC2 Histone deacetylase 2	4
IPI00017448	RPS21 40S ribosomal protein S21	3
IPI00414860	RPL37A 60S ribosomal protein L37a	3
IPI00015309	KRT12 Keratin type I cytoskeletal 12	3
IPI00395865	RBBP7 Histone-binding protein RBBP7	3
IPI00472614	ERC2 ERC protein 2	3
IPI00218207	SPTBN2 Isoform 2 of Spectrin beta chain brain 2	3
IPI00010903	DOPEY1 Uncharacterized protein	3
IPI00218371	PRPS1L1 Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3	3
IPI00018350	MCM5 DNA replication licensing factor MCM5	3
IPI00219156	RPL30 60S ribosomal protein L30	3
IPI00069084	TRRAP Isoform 1 of Transformation/transcription domain-associated protein	3
IPI00181617	RBM34 Isoform 1 of RNA-binding protein 34	3
IPI00217507	NEFM Neurofilament medium polypeptide	3
IPI00178352	FLNC Isoform 1 of Filamin-C	3
IPI00334914	TRMT1L Isoform 1 of TRMT1-like protein	3
IPI00641788	SNRPC U1 small nuclear ribonucleoprotein C	3
IPI00169325	WDR36 WD repeat-containing protein 36	3
IPI00743194	- Kappa light chain variable region (Fragment)	3
IPI00021728	EIF2S2 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	3
IPI00003269	ACTBL2 Beta-actin-like protein 2	3
IPI00294955	LSM4 U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM4	3
IPI00909544	DDX3X cDNA FLJ52848 highly similar to ATP-dependent RNA helicase DDX3X	3
IPI00879639	MFGE8 HP47 protein (Fragment)	3
IPI00165947	FGFR1 basic fibroblast growth factor receptor 1 isoform 11 precursor	3
IPI00031423	KRT33B Keratin type I cuticular Ha3-II	3
IPI00027107	TUFM elongation factor Tu mitochondrial precursor	3
IPI00013890	SFN Isoform 1 of 14-3-3 protein sigma	3
IPI00305833	SMU1 WD40 repeat-containing protein SMU1	3
IPI00164949	TH1L TH1-like (Drosophila) isoform CRA_b	3
IPI00746221	FAM195B Protein FAM195B	3
IPI00789041	PNN Isoform 1 of Pinin	3
IPI00182289	RPS29 40S ribosomal protein S29	3
IPI00002689	TRPC4 Isoform Alpha of Short transient receptor potential channel 4	3
IPI00031508	DHX8 ATP-dependent RNA helicase DHX8	3
IPI01010550	DHX8 Uncharacterized protein	3
IPI00893362	RYR3 Uncharacterized protein	3
IPI00165981	ZNFX1 Isoform 1 of NFX1-type zinc finger-containing protein 1	3
IPI00220344	RPL36A 60S ribosomal protein L36a isoform a	3
IPI00739565	UNC13C Protein unc-13 homolog C	3
IPI00217960	PRKACA Isoform 2 of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	3
IPI00383815	GFAP Isoform 2 of Glial fibrillary acidic protein	3
IPI00910759	- cDNA FLJ79368 highly similar to Spliceosome RNA helicase Bat1	3
IPI00023591	PURA Transcriptional activator protein Pur-alpha	3
IPI00060800	ZG16B Zymogen granule protein 16 homolog B	3
IPI00021298	KRT20 Keratin type I cytoskeletal 20	3
IPI00419963	MAEA Isoform 4 of Macrophage erythroblast attacher	3
IPI00001757	RBM8A Isoform 1 of RNA-binding protein 8A	3

IPI00008085	SLC39A10 Zinc transporter ZIP10	3
IPI00218733	SOD1 Superoxide dismutase [Cu-Zn]	3
IPI00022744	CSE1L Isoform 1 of Exportin-2	3
IPI00168184	PPP2R1A cDNA FLJ56053 highly similar to Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 k	3
IPI00514399	RPS27 Uncharacterized protein	3
IPI00658130	IGLV2-11 IGL@ protein	3
IPI00328268	EIF4G3 eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 isoform 1	3
IPI00297982	EIF2S3 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	3
IPI00888712	POTEKP Putative beta-actin-like protein 3	3
IPI00465084	DES Desmin	3
IPI00646555	SCAND3 SCAN domain-containing protein 3	3
IPI00017341	SF3A2 SF3A2 protein (Fragment)	3
IPI00018510	SPIN2A Spindlin-2A	3
IPI00043863	MAP4 Uncharacterized protein	3
IPI00010740	SFPQ Isoform Long of Splicing factor proline- and glutamine-rich	3
IPI00003377	SRSF7 Isoform 1 of Serine/arginine-rich splicing factor 7	3
IPI00419504	TAB2 Isoform 1 of TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2	3
IPI00983638	MTDH Protein	3
IPI00967876	RPL9 Protein	3
IPI00981659	- Similar to Cold agglutinin FS-1 H-chain	3
IPI00419585	PPIA Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	3
IPI00174345	SPAG17 Sperm-associated antigen 17	3
IPI00011893	- mRNA clone with similarity to L-glycerol-3-phosphate:NAD oxidoreductase and albumin	3
IPI00001712	CTNNA3 Isoform 1 of Catenin alpha-3	3
IPI00217540	KDM1A Isoform 2 of Lysine-specific histone demethylase 1A	3
IPI00909288	- cDNA FLJ51586 moderately similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	3
IPI00430472	ASCC3 Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	3
IPI00103483	COBRA1 Negative elongation factor B	3
IPI00002335	HTT huntingtin	3
IPI00455626	RPTN Repetin	3
IPI00002236	MFGE8 cDNA FLJ59612 highly similar to Lactadherin	3
IPI01022498	NAP1L1 Uncharacterized protein	3
IPI00985001	PABPC4 Protein	3
IPI00556594	ZCCHC8 Isoform 1 of Zinc finger CCHC domain-containing protein 8	3
IPI00549725	PGAM1 Phosphoglycerate mutase 1	3
IPI00020692	SCN3A Isoform 1 of Sodium channel protein type 3 subunit alpha	3
IPI00300053	KRT82 Keratin type II cuticular Hb2	2
IPI00829827	- 13 kDa protein	2
IPI00375843	KRT80 Isoform 3 of Keratin type II cytoskeletal 80	2
IPI00829947	IGKV1-5 Similar to Ig kappa chain V-II region GM607 precursor	2
IPI00387110	- Ig kappa chain V-II region MIL	2
IPI00292326	SPAG1 Sperm-associated antigen 1	2
IPI00301503	TRA2B Isoform 1 of Transformer-2 protein homolog beta	2

Résumé des données des criblages fonctionnels. Résultats des criblages aux shARNs ciblant 21 interactants de la CTNNB1 (cinq shARN indépendants par gène). Les résultats sont présentés en pourcentage d'inhibition pour deux expériences indépendantes et leur moyenne dans les criblages WNT3A, BIO et EF1 α .

TRC Id	NM ID	Gene ID	SeV n=1	SeV n=2	SeV average	WNT3A n=1	WNT3A n=2	WNT3A average	BIO n=1	BIO n=2	BIO average	pEF1a n=1	pEF1a n=2	pEF1a average
TRCN000157145	NM_005998	CCT3	22%	35%	29%	-1%	38%	18%	42%	69%	47%	-4%	3%	0%
TRCN000155458	NM_005998	CCT3	-234%	-161%	-198%	-112%	-59%	-85%	-294%	-68%	-242%	3%	19%	11%
TRCN000154461	NM_005998	CCT3	56%	37%	46%	15%	42%	28%	-8%	7%	-18%	-32%	-5%	-18%
TRCN000156792	NM_005998	CCT3	16%	-1%	7%	-23%	25%	1%	-400%	-77%	-315%	-13%	2%	-6%
TRCN000154796	NM_005998	CCT3	9%	33%	21%	85%	91%	88%	85%	91%	85%	-24%	23%	0%
TRCN000148903	NM_004389	CTNNA2	-212%	-91%	-151%	-3%	18%	7%	-132%	-31%	-118%	-11%	5%	-3%
TRCN000149367	NM_004389	CTNNA2	-1%	20%	9%	-251%	-43%	-147%	-245%	-54%	-202%	-23%	-10%	-16%
TRCN000150270	NM_004389	CTNNA2	-77%	11%	-33%	9%	-1%	4%	-109%	21%	-76%	-15%	-7%	-11%
TRCN000147074	NM_004389	CTNNA2	-25%	39%	7%	-164%	-15%	-89%	19%	52%	23%	-9%	2%	-4%
TRCN000147992	NM_004389	CTNNA2	-10%	48%	19%	-13%	24%	6%	-218%	1%	-157%	-37%	-7%	-22%
TRCN000159814	NM_013266	CTNNA3	4%	-17%	-6%	21%	61%	41%	-104%	28%	-70%	-18%	15%	-2%
TRCN000158421	NM_013266	CTNNA3	34%	-11%	11%	-39%	14%	-12%	-231%	-71%	-202%	8%	-6%	1%
TRCN000160322	NM_013266	CTNNA3	-12%	-68%	-40%	-47%	-24%	-35%	-40%	-23%	-53%	-36%	-14%	-25%
TRCN000160161	NM_013266	CTNNA3	9%	-15%	-3%	-105%	-33%	-69%	-55%	-17%	-60%	5%	12%	9%
TRCN000160465	NM_013266	CTNNA3	20%	61%	41%	16%	38%	27%	-19%	-24%	-40%	-34%	-16%	-25%
TRCN000082853	NM_001923	DDB1	66%	64%	65%	-209%	-132%	-171%	29%	-47%	-41%	-19%	28%	5%
TRCN000082854	NM_001923	DDB1	-8%	50%	21%	-21%	16%	-3%	-107%	-7%	-149%	-23%	-14%	-19%
TRCN000082855	NM_001923	DDB1	-196%	-105%	-150%	20%	-9%	5%	45%	43%	19%	15%	39%	27%
TRCN000082856	NM_001923	DDB1	-98%	-56%	-77%	-43%	3%	-20%	-66%	-9%	-111%	5%	35%	20%
TRCN000082857	NM_001923	DDB1	-74%	-49%	-61%	-520%	-234%	-377%	-70%	-69%	-145%	-26%	17%	-4%
TRCN000074693	NM_004397	DDX6	-146%	-50%	-98%	-56%	22%	-17%	25%	32%	-5%	-27%	22%	-3%
TRCN000074694	NM_004397	DDX6	-334%	-15%	-174%	-44%	48%	2%	-107%	29%	-71%	6%	-11%	-2%
TRCN000074695	NM_004397	DDX6	83%	63%	73%	-173%	-20%	-96%	-301%	-86%	-372%	-25%	-3%	-14%
TRCN000074696	NM_004397	DDX6	38%	27%	32%	-15%	25%	5%	-41%	-6%	-86%	-8%	4%	-2%
TRCN000074697	NM_004397	DDX6	-37%	-51%	-44%	-108%	6%	-51%	-25%	-27%	-82%	7%	10%	8%
TRCN000017453	NM_203394	E2F7	71%	66%	68%	-59%	20%	-19%	41%	30%	26%	-30%	12%	-9%
TRCN000017454	NM_203394	E2F7	43%	45%	44%	-103%	-1%	-52%	14%	32%	10%	-53%	10%	-22%
TRCN000017455	NM_203394	E2F7	14%	-17%	-2%	9%	31%	20%	-78%	-46%	-90%	-19%	12%	-4%
TRCN000017456	NM_203394	E2F7	11%	-38%	-14%	26%	48%	37%	-112%	11%	-83%	-22%	1%	-11%
TRCN000017457	NM_203394	E2F7	-1%	-27%	-14%	32%	53%	43%	-23%	18%	-22%	-19%	9%	-5%
TRCN000074788	NM_003908	EIF2S2	0%	-20%	-10%	-37%	10%	-14%	24%	27%	-9%	-27%	-8%	-17%
TRCN000074789	NM_003908	EIF2S2	51%	40%	45%	-19%	46%	14%	-58%	-5%	-101%	0%	-8%	-4%
TRCN000074790	NM_003908	EIF2S2	30%	11%	20%	48%	56%	52%	54%	46%	30%	4%	21%	13%
TRCN000074791	NM_003908	EIF2S2	13%	20%	17%	61%	78%	69%	51%	49%	28%	40%	34%	37%
TRCN000074792	NM_003908	EIF2S2	-173%	-26%	-99%	61%	75%	68%	65%	66%	50%	14%	28%	21%
TRCN000116102	NM_018303	EXOC2	-41%	25%	-8%	-9%	-58%	-33%	73%	22%	36%	-15%	-4%	-10%
TRCN000116103	NM_018303	EXOC2	-58%	1%	-29%	-74%	-39%	-57%	-23%	-37%	-85%	-17%	-11%	-14%
TRCN000116104	NM_018303	EXOC2	-8%	22%	7%	-42%	-7%	-24%	11%	1%	-34%	-8%	-7%	-8%
TRCN000116105	NM_018303	EXOC2	-63%	-11%	-37%	-25%	42%	8%	-37%	97%	-31%	-16%	-4%	-10%
TRCN000116106	NM_018303	EXOC2	0%	-50%	-25%	-10%	32%	11%	28%	44%	4%	-17%	2%	-7%

TRCN000195103	NM_004964	HDAC1	-119%	11%	-54%	-100%	-12%	-56%	-246%	-141%	-246%	14%	10%	12%
TRCN000004814	NM_004964	HDAC1	-175%	-175%	-175%	-497%	-218%	-358%	28%	7%	6%	-13%	13%	0%
TRCN000004818	NM_004964	HDAC1	-29%	-76%	-53%	-47%	25%	-11%	55%	32%	36%	-40%	29%	-6%
TRCN000195467	NM_004964	HDAC1	-191%	-136%	-163%	10%	37%	24%	83%	89%	83%	10%	23%	17%
TRCN000197198	NM_004964	HDAC1	-257%	-90%	-173%	-155%	-46%	-101%	-10%	17%	-13%	-3%	1%	-1%
TRCN000004819	NM_001527	HDAC2	-172%	-173%	-172%	-99%	-69%	-84%	42%	-14%	5%	0%	16%	8%
TRCN000004823	NM_001527	HDAC2	57%	42%	50%	93%	20%	57%	-14%	-62%	-55%	-39%	7%	-16%
TRCN000197086	NM_001527	HDAC2	-44%	15%	-15%	-216%	-177%	-196%	-332%	-240%	-353%	14%	32%	23%
TRCN000196590	NM_001527	HDAC2	-120%	-55%	-88%	-35%	26%	-5%	-233%	-96%	-216%	-4%	0%	-2%
TRCN000195198	NM_001527	HDAC2	52%	45%	49%	12%	22%	17%	-128%	-119%	-159%	-28%	1%	-13%
TRCN000154305	NM_005336	HDLBP	60%	15%	38%	-63%	-59%	-61%	-26%	40%	-12%	-32%	-11%	-21%
TRCN000151220	NM_005336	HDLBP	-540%	-403%	-472%	-130%	-67%	-98%	-108%	-17%	-94%	-24%	-8%	-16%
TRCN000153823	NM_005336	HDLBP	30%	-2%	14%	-180%	-81%	-130%	-134%	15%	-96%	-4%	6%	1%
TRCN000150941	NM_005336	HDLBP	8%	23%	15%	-36%	84%	24%	65%	82%	68%	-13%	9%	-2%
TRCN000153797	NM_005336	HDLBP	-42%	-27%	-34%	-259%	-159%	-209%	-193%	-48%	-166%	3%	8%	6%
TRCN000016428	NM_017544	NKRF	-98%	-161%	-129%	70%	71%	70%	42%	52%	38%	-30%	18%	-6%
TRCN000016429	NM_017544	NKRF	-8%	-102%	-55%	-30%	22%	-4%	-78%	-10%	-71%	-14%	6%	-4%
TRCN000016430	NM_017544	NKRF	-197%	-295%	-246%	-3%	-36%	-19%	6%	14%	-4%	20%	43%	32%
TRCN000016431	NM_017544	NKRF	2%	-35%	-16%	99%	-13%	43%	-137%	55%	-78%	5%	29%	17%
TRCN000016432	NM_017544	NKRF	26%	34%	30%	99%	20%	59%	-5%	45%	4%	10%	17%	14%
TRCN000130400	NM_015354	NUP188	-64%	-23%	-43%	-629%	-526%	-577%	-69%	12%	-55%	3%	-3%	0%
TRCN000146357	NM_015354	NUP188	-31%	-76%	-54%	-34%	-55%	-45%	-26%	19%	-23%	-10%	-6%	-8%
TRCN000146975	NM_015354	NUP188	30%	46%	38%	-13%	6%	-3%	-241%	4%	-171%	-5%	-1%	-3%
TRCN000149292	NM_015354	NUP188	-24%	3%	-10%	-201%	-172%	-187%	-789%	-80%	-572%	19%	25%	22%
TRCN000014533	NM_005859	PURA	45%	11%	28%	47%	21%	34%	-27%	32%	-17%	-20%	9%	-6%
TRCN000014534	NM_005859	PURA	67%	11%	39%	41%	61%	51%	-72%	3%	-61%	-17%	10%	-4%
TRCN000014535	NM_005859	PURA	2%	-51%	-25%	23%	37%	30%	-113%	-9%	-94%	-30%	3%	-14%
TRCN000014536	NM_005859	PURA	0%	-27%	-13%	28%	26%	27%	-67%	-72%	-96%	-22%	6%	-8%
TRCN000014537	NM_005859	PURA	-63%	-133%	-98%	18%	57%	38%	-251%	52%	-153%	-12%	11%	0%
TRCN000000039	NM_005850	SF3B4	81%	93%	87%	-3%	-2%	-2%	-21%	-23%	-41%	13%	35%	24%
TRCN000000040	NM_005850	SF3B4	83%	85%	84%	-447%	-190%	-318%	78%	-31%	20%	30%	56%	43%
TRCN000000041	NM_005850	SF3B4	88%	85%	86%	-846%	-783%	-814%	-25%	-151%	-107%	14%	48%	31%
TRCN000000042	NM_005850	SF3B4	66%	70%	68%	-106%	-127%	-117%	-258%	-142%	-255%	-4%	30%	13%
TRCN000000043	NM_005850	SF3B4	-119%	-22%	-71%	44%	65%	54%	40%	48%	35%	16%	35%	25%
TRCN000062538	NM_006444	SMC2	-153%	-35%	-94%	19%	56%	37%	-74%	-28%	-51%	-4%	-4%	-4%
TRCN000062539	NM_006444	SMC2	37%	-16%	10%	-104%	-81%	-92%	-3%	96%	46%	-8%	0%	-4%
TRCN000062540	NM_006444	SMC2	-405%	-407%	-406%	-65%	-12%	-39%	-162%	66%	-48%	-1%	14%	6%
TRCN000062541	NM_006444	SMC2	48%	23%	36%	20%	-12%	4%	-126%	-85%	-106%	-14%	-15%	-14%
TRCN000062542	NM_006444	SMC2	-92%	-98%	-95%	14%	25%	20%	25%	56%	41%	-10%	0%	-5%

TRCN000062538	NM_006444	SMC2	-153%	-35%	-94%	19%	56%	37%	-74%	-28%	-51%	-4%	-4%	-4%
TRCN000062539	NM_006444	SMC2	37%	-16%	10%	-104%	-81%	-92%	-3%	96%	46%	-8%	0%	-4%
TRCN000062540	NM_006444	SMC2	-405%	-407%	-406%	-65%	-12%	-39%	-162%	66%	-48%	-1%	14%	6%
TRCN000062541	NM_006444	SMC2	48%	23%	36%	20%	-12%	4%	-126%	-85%	-106%	-14%	-15%	-14%
TRCN000062542	NM_006444	SMC2	-92%	-98%	-95%	14%	25%	20%	25%	56%	41%	-10%	0%	-5%
TRCN000149306	NM_145207	SPATA5	23%	13%	18%	8%	44%	26%	44%	61%	44%	-22%	-9%	-15%
TRCN000149738	NM_145207	SPATA5	-66%	-28%	-47%	72%	82%	77%	38%	73%	46%	18%	19%	18%
TRCN000149650	NM_145207	SPATA5	19%	40%	29%	-31%	44%	7%	-33%	17%	-29%	-10%	1%	-5%
TRCN000149995	NM_145207	SPATA5	-12%	10%	-1%	89%	92%	90%	69%	81%	70%	-1%	9%	4%
TRCN000001160	NM_007279	U2AF2	16%	16%	16%	-32%	14%	-9%	20%	3%	-1%	-21%	14%	-3%
TRCN000001161	NM_007279	U2AF2	46%	58%	52%	1%	10%	5%	-7%	-23%	-31%	-37%	10%	-13%
TRCN000001162	NM_007279	U2AF2	-20%	33%	7%	-171%	-101%	-136%	-100%	-21%	-92%	-34%	15%	-10%
TRCN000001163	NM_007279	U2AF2	-47%	52%	3%	-284%	-93%	-189%	21%	38%	17%	-12%	44%	16%
TRCN000001164	NM_007279	U2AF2	-64%	16%	-24%	51%	45%	48%	40%	1%	12%	18%	29%	23%
TRCN000004520	NM_020120	UGGT1	27%	32%	29%	-28%	-3%	-16%	-189%	-81%	-179%	10%	-2%	4%
TRCN000004521	NM_020120	UGGT1	46%	44%	45%	-25%	32%	4%	-160%	-54%	-147%	-24%	11%	-6%
TRCN000004522	NM_020120	UGGT1	-17%	19%	1%	-107%	-43%	-75%	-162%	-25%	-134%	-23%	2%	-11%
TRCN000004523	NM_020120	UGGT1	-70%	15%	-27%	-92%	-44%	-68%	-34%	9%	-33%	12%	0%	6%
TRCN000004524	NM_020120	UGGT1	-18%	-23%	-20%	-100%	-11%	-56%	47%	-29%	1%	-26%	8%	-9%
TRCN000004516	NM_020119	ZC3HAV1 (ZAPS)	-236%	-187%	-212%	-109%	-39%	-74%	-5%	-47%	-42%	-58%	-6%	-32%
TRCN000004517	NM_020119	ZC3HAV1 (ZAPS)	4%	42%	23%	54%	60%	57%	31%	44%	27%	9%	27%	18%
TRCN000004518	NM_020119	ZC3HAV1 (ZAPS)	20%	2%	11%	34%	9%	22%	87%	65%	74%	-38%	15%	-12%
TRCN000004519	NM_020119	ZC3HAV1 (ZAPS)	64%	38%	51%	-11%	15%	2%	-44%	46%	-22%	-44%	22%	-11%
TRCN000010886	NM_020119	ZC3HAV1 (ZAPS)	-45%	-102%	-74%	24%	31%	27%	1%	19%	-5%	-22%	-14%	-18%
TRCN000157044	NM_181781	ZNF326	74%	74%	74%	86%	94%	90%	68%	84%	71%	8%	3%	5%
TRCN000152268	NM_181781	ZNF326	-59%	-104%	-81%	30%	63%	46%	28%	60%	33%	-18%	13%	-3%
TRCN000155774	NM_181781	ZNF326	-66%	-16%	-41%	42%	31%	37%	36%	9%	13%	-22%	-2%	-12%
TRCN000154595	NM_181781	ZNF326	64%	70%	67%	1%	43%	22%	66%	26%	41%	-6%	10%	2%
TRCN000150698	NM_181781	ZNF326	-163%	-163%	-163%	28%	60%	44%	62%	47%	48%	5%	28%	17%

Annexe 2: Supplemental tables for LC-MS/MS (BIO)

LC-MS/MS data. IPI ID, HUGO annotation protein name and description, the number of identified peptides for the 586 proteins reproducibly identified in at least two independent experiments with two or more peptides.

IPI ID	Protein name and description	Number of peptides
IPI00017292	CTNNB1 Isoform 1 of Catenin beta-1	178
IPI00012391	APC Isoform Long of Adenomatous polyposis coli protein	159
IPI00019359	KRT9 Keratin type I cytoskeletal 9	123
IPI00220327	KRT1 Keratin type II cytoskeletal 1	113
IPI00441473	PRMT5 Protein arginine N-methyltransferase 5	99
IPI00009865	KRT10 Keratin type I cytoskeletal 10	93
IPI00215948	CTNNA1 Isoform 1 of Catenin alpha-1	86
IPI00022542	ROCK1 Rho-associated protein kinase 1	83
IPI00021304	KRT2 Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal	77
IPI00012079	EIF4B Eukaryotic translation initiation factor 4B	76
IPI00009867	KRT5 Keratin type II cytoskeletal 5	61
IPI00300725	KRT6A Keratin type II cytoskeletal 6A	58
IPI00026089	SF3B1 Splicing factor 3B subunit 1	56
IPI00217963	KRT16 Keratin type I cytoskeletal 16	56
IPI00299145	KRT6C Keratin type II cytoskeletal 6C	56
IPI00328230	SPTBN1 Isoform Short of Spectrin beta chain brain 1	55
IPI01008793	RBM10 RNA-binding protein 10 isoform 5	55
IPI00293665	KRT6B Keratin type II cytoskeletal 6B	54
IPI00796776	KRT5 cDNA FLJ54081 highly similar to Keratin type II cytoskeletal 5	54
IPI00007928	PRPF8 Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	53
IPI00029012	EIF3A Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	53
IPI00384444	KRT14 Keratin type I cytoskeletal 14	52
IPI00604620	NCL Nucleolin	51
IPI00745872	ALB Isoform 1 of Serum albumin	50
IPI00006079	BCLAF1 Isoform 1 of Bcl-2-associated transcription factor 1	49
IPI00022434	ALB Uncharacterized protein	49
IPI00942246	AMPD2 Isoform Ex1B-2-3 of AMP deaminase 2	49
IPI00413672	BCLAF1 Isoform 3 of Bcl-2-associated transcription factor 1	47
IPI00782992	SRRM2 Isoform 1 of Serine/arginine repetitive matrix protein 2	47
IPI00171903	HNRNPM Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	46
IPI00302592	FLNA Isoform 2 of Filamin-A	45
IPI00300371	SF3B3 Isoform 1 of Splicing factor 3B subunit 3	44
IPI00843765	SPTAN1 Isoform 3 of Spectrin alpha chain brain	44
IPI00910738	KRT6B cDNA FLJ60647 highly similar to Keratin type II cytoskeletal 6B	44
IPI00104050	THRAP3 Thyroid hormone receptor-associated protein 3	43
IPI00420014	SNRNP200 Isoform 1 of U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	42
IPI00003865	HSPA8 Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein	40
IPI00008524	PABPC1 Isoform 1 of Polyadenylate-binding protein 1	39
IPI00171336	RIOK1 Serine/threonine-protein kinase RIO1	39
IPI00221106	SF3B2 Splicing factor 3B subunit 2	39
IPI00796945	PABPC1 cDNA FLJ37875 fis clone BRSSN2018771 highly similar to Poly(A)-binding protein 1	38
IPI00789324	JUP Uncharacterized protein	37
IPI00003918	RPL4 60S ribosomal protein L4	36
IPI00014264	ACAP2 Arf-GAP with coiled-coil ANK repeat and PH domain-containing protein 2	36
IPI00450768	KRT17 Keratin type I cytoskeletal 17	36
IPI00305267	GOLGA3 Isoform 1 of Golgin subfamily A member 3	35
IPI00012202	WDR77 Methylosome protein 50	32
IPI00013933	DSP Isoform DPI of Desmoplakin	32
IPI00479217	HNRNPU Isoform Short of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	32
IPI00031812	YBX1 Nuclease-sensitive element-binding protein 1	31
IPI00218130	PYGM Glycogen phosphorylase muscle form	30
IPI00219866	ZRANB2 Isoform 2 of Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	30
IPI00554711	JUP Junction plakoglobin	30
IPI00003519	EFTUD2 116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	29
IPI00143753	U2SURP Isoform 1 of U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	29
IPI00396370	EIF3B Isoform 1 of Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	29
IPI00549248	NPM1 Isoform 1 of Nucleophosmin	29
IPI00216049	HNRNPK Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	28

IPI00966302	U2SURP Uncharacterized protein	28
IPI00004968	PRPF19 Pre-mRNA-processing factor 19	27
IPI00015953	DDX21 Isoform 1 of Nucleolar RNA helicase 2	27
IPI00396485	EEF1A1 Elongation factor 1-alpha 1	27
IPI00642971	EEF1D Isoform 2 of Elongation factor 1-delta	27
IPI00706094	CSN1S1 Alpha-S1-casein precursor	27
IPI00000875	EEF1G cDNA FLJ56389 highly similar to Elongation factor 1-gamma	26
IPI01025520	PRMT5 20 kDa protein	26
IPI00003362	HSPA5 78 kDa glucose-regulated protein	25
IPI00027251	STK38 Serine/threonine-protein kinase 38	25
IPI00398625	HRNR Hornerin	25
IPI00739940	FRYL Isoform 1 of Protein furry homolog-like	25
IPI00027834	HNRNPL Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	24
IPI00296337	PRKDC Isoform 1 of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	24
IPI00647794	WDR77 WD repeat domain 77	24
IPI01009986	EEF1D Uncharacterized protein	24
IPI00024466	UGGT1 Isoform 1 of UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase 1	23
IPI00185919	LARP1 Isoform 1 of La-related protein 1	23
IPI00790342	RPL6 60S ribosomal protein L6	23
IPI00984346	- Conserved hypothetical protein	23
IPI00011253	RPS3 40S ribosomal protein S3	22
IPI00013788	HTATSF1 HIV Tat-specific factor 1	22
IPI00217030	RPS4X 40S ribosomal protein S4 X isoform	22
IPI00021439	ACTB Actin cytoplasmic 1	21
IPI00465370	RNF219 RING finger protein 219	21
IPI00698843	CSN1S2 Alpha-S2-casein precursor	21
IPI00743859	CTNNA2 Isoform 2 of Catenin alpha-2	21
IPI01012991	LUC7L2 Isoform 1 of Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	21
IPI00555747	PABPC4 Isoform 2 of Polyadenylate-binding protein 4	20
IPI00651653	DDX17 probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 isoform 3	20
IPI00697085	CSN2 Beta-casein precursor	20
IPI01008748	LUC7L2 Isoform 2 of Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	20
IPI00005859	KRT75 Keratin type II cytoskeletal 75	19
IPI00301154	PABPC3 Polyadenylate-binding protein 3	19
IPI00307259	DNAJC13 DnaJ homolog subfamily C member 13	19
IPI00376379	KRT77 Keratin type II cytoskeletal 1b	19
IPI00930688	TUBA1B Tubulin alpha-1B chain	19
IPI01015522	ACTB cDNA FLJ55253 highly similar to Actin cytoplasmic 1	19
IPI01019113	TUBB Tubulin beta chain	19
IPI00008529	RPLP2 60S acidic ribosomal protein P2	18
IPI00008530	RPLP0 60S acidic ribosomal protein P0	18
IPI00013214	MCM3 cDNA FLJ55599 highly similar to DNA replication licensing factor MCM3	18
IPI00013485	RPS2 40S ribosomal protein S2	18
IPI00026320	UBR5 E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	18
IPI00026612	PPM1B Isoform Beta-1 of Protein phosphatase 1B	18
IPI00186290	EEF2 Elongation factor 2	18
IPI00465361	RPL13 60S ribosomal protein L13	18
IPI00470497	SERBP1 Isoform 2 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	18
IPI00008359	KRT76 Keratin type II cytoskeletal 2 oral	17
IPI00016801	GLUD1 Glutamate dehydrogenase 1 mitochondrial	17
IPI00021840	RPS6 40S ribosomal protein S6	17
IPI00024933	RPL12 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L12	17
IPI00292000	PRPF31 Isoform 1 of U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	17
IPI00479262	EIF4G1 eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 isoform 1	17
IPI00555744	RPL14 Ribosomal protein L14 variant	17
IPI00005675	NKRF NF-kappa-B-repressing factor	16
IPI00008240	MARS Methionyl-tRNA synthetase cytoplasmic	16
IPI00017617	DDX5 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	16
IPI00025753	DSG1 Desmoglein-1	16
IPI00290857	KRT3 Keratin type II cytoskeletal 3	16
IPI00396435	DHX15 Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	16

IPI00412579	RPL10A 60S ribosomal protein L10a	16
IPI00550655	SPIN1 Spindlin-1	16
IPI00004358	PYGB Glycogen phosphorylase brain form	15
IPI00004795	CLNS1A Methylosome subunit pICln	15
IPI00007702	HSPA2 Heat shock-related 70 kDa protein 2	15
IPI00008433	RPS5 40S ribosomal protein S5	15
IPI00010700	PRRC2A Isoform 1 of Protein PRRC2A	15
IPI00017451	SF3A1 Splicing factor 3A subunit 1	15
IPI00019459	TAB1 TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1	15
IPI00169307	ARHGAP21 rho GTPase-activating protein 21	15
IPI00182533	RPL28 60S ribosomal protein L28	15
IPI00215637	DDX3X ATP-dependent RNA helicase DDX3X	15
IPI00305068	PRPF6 Pre-mRNA-processing factor 6	15
IPI00465233	EIF3L Uncharacterized protein	15
IPI00465294	CDC5L Cell division cycle 5-like protein	15
IPI00005024	MYBBP1A Isoform 1 of Myb-binding protein 1A	14
IPI00007750	TUBA4A Tubulin alpha-4A chain	14
IPI00007752	TUBB2C Tubulin beta-2C chain	14
IPI00009866	KRT13 Isoform 1 of Keratin type I cytoskeletal 13	14
IPI00012772	RPL8 60S ribosomal protein L8	14
IPI00013881	HNRNP1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	14
IPI00022774	VCP Transitional endoplasmic reticulum ATPase	14
IPI00028931	DSG2 Desmoglein-2	14
IPI00031691	RPL9 60S ribosomal protein L9	14
IPI00159899	ANKFY1 Isoform 1 of Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1	14
IPI00241841	KRT79 Keratin type II cytoskeletal 79	14
IPI00299254	EIF5B Eukaryotic translation initiation factor 5B	14
IPI00472887	CKAP5 Isoform 2 of Cytoskeleton-associated protein 5	14
IPI00743802	PPM1B Isoform Beta-2 of Protein phosphatase 1B	14
IPI00747002	AXIN1 Isoform 1 of Axin-1	14
IPI00011694	PRSS1 Trypsin-1	13
IPI00012795	EIF3I Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	13
IPI00013415	RPS7 40S ribosomal protein S7	13
IPI00014319	IVNS1ABP Influenza virus NS1A-binding protein	13
IPI00018971	TRIM21 Isoform 1 of E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21	13
IPI00021428	ACTA1 Actin alpha skeletal muscle	13
IPI00215780	RPS19 40S ribosomal protein S19	13
IPI00221092	RPS16 40S ribosomal protein S16	13
IPI00293655	DDX1 ATP-dependent RNA helicase DDX1	13
IPI00418471	VIM Vimentin	13
IPI00553185	CCT3 T-complex protein 1 subunit gamma	13
IPI00643152	HSPA1L cDNA FLJ56386 highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1L	13
IPI00844578	DHX9 ATP-dependent RNA helicase A	13
IPI00925547	LTF Uncharacterized protein	13
IPI00013475	TUBB2A Tubulin beta-2A chain	12
IPI00019038	LYZ Lysozyme C	12
IPI00021417	SART1 U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	12
IPI00025001	CTNBP1 Beta-catenin-interacting protein 1	12
IPI00025091	RPS11 40S ribosomal protein S11	12
IPI00025329	RPL19 60S ribosomal protein L19	12
IPI00221088	RPS9 40S ribosomal protein S9	12
IPI00306332	RPL24 60S ribosomal protein L24	12
IPI00382470	HSP90AA1 Isoform 2 of Heat shock protein HSP 90-alpha	12
IPI00382516	PRMT1 protein arginine N-methyltransferase 1 isoform 3	12
IPI00470528	RPL15 60S ribosomal protein L15	12
IPI00642862	PPIL4 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4	12
IPI00647650	EIF3H cDNA FLJ35809 fis clone TEST12006016 highly similar to Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 3	12
IPI00783392	RB1CC1 Isoform 1 of RB1-inducible coiled-coil protein 1	12
IPI00977661	RPL17-C18ORF32 RPL17-C18orf32 protein isoform 1	12
IPI01013939	CTTN src substrate cortactin isoform c	12

IPI01013939	CTTN src substrate cortactin isoform c	12
IPI00010204	SRSF3 Serine/arginine-rich splicing factor 3	11
IPI00014230	C1QBP Complement component 1 Q subcomponent-binding protein mitochondrial	11
IPI00026202	RPL18A 60S ribosomal protein L18a	11
IPI00027146	GLUD2 Glutamate dehydrogenase 2 mitochondrial	11
IPI00031801	CSDA Isoform 1 of DNA-binding protein A	11
IPI00167391	FAM123B Isoform 1 of Protein FAM123B	11
IPI00180730	- Similar to Elongation factor 1-alpha 1	11
IPI00183572	DOCK7 Isoform 2 of Dedicator of cytokinesis protein 7	11
IPI00217357	CCAR1 Isoform 1 of Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	11
IPI00218566	MAP3K7 Isoform 1A of Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	11
IPI00219018	GAPDH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	11
IPI00290460	EIF3G Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	11
IPI00302925	CCT8 59 kDa protein	11
IPI00456758	RPL27A 60S ribosomal protein L27a	11
IPI00477227	KRT78 Isoform 1 of Keratin type II cytoskeletal 78	11
IPI00550689	C22orf28 tRNA-splicing ligase RtcB homolog	11
IPI00658202	CDH2 cDNA FLJ53252 highly similar to Cadherin-2	11
IPI01014089	PRRC2C Isoform 3 of Protein PRRC2C	11
IPI01021320	RPLP0 Uncharacterized protein	11
IPI00005198	ILF2 Interleukin enhancer-binding factor 2	10
IPI00006099	BMS1 Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	10
IPI00008557	IGF2BP1 Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	10
IPI00012268	PSMD2 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	10
IPI00016634	C20orf11 Protein C20orf11	10
IPI00027270	RPL26 60S ribosomal protein L26	10
IPI00029628	RCN2 Reticulocalbin-2	10
IPI00169276	- Putative trypsin-6	10
IPI00174775	KRT73 Isoform 1 of Keratin type II cytoskeletal 73	10
IPI00176702	CAMSAP3 Isoform 1 of Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3	10
IPI00176706	RBM17 Splicing factor 45	10
IPI00216694	PLS3 Plastin-3	10
IPI00218606	RPS23 40S ribosomal protein S23	10
IPI00220503	DCTN2 Isoform 2 of Dynactin subunit 2	10
IPI00290077	KRT15 Keratin type I cytoskeletal 15	10
IPI00306749	SLC4A1AP Kanadaplin	10
IPI00339269	HSPA6 Heat shock 70 kDa protein 6	10
IPI00386879	IGHA1 cDNA FLJ14473 fis clone MAMMA1001080 highly similar to Homo sapiens SNC73 protein (SNC73) mRNA	10
IPI00397801	FLG2 Filaggrin-2	10
IPI00479145	KRT19 Keratin type I cytoskeletal 19	10
IPI00479743	POTEE Isoform 1 of POTE ankyrin domain family member E	10
IPI00479786	KHSRP Isoform 1 of Far upstream element-binding protein 2	10
IPI00654777	EIF3F cDNA FLJ36192 fis clone TESTI2027450 highly similar to Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 5	10
IPI00745038	LRCH2 Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 2	10
IPI00000816	YWHAE Isoform 1 of 14-3-3 protein epsilon	9
IPI00006181	EIF3D Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	9
IPI00008708	RSL1D1 Ribosomal L1 domain-containing protein 1	9
IPI00010153	RPL23 60S ribosomal protein L23	9
IPI00013068	EIF3E Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	9
IPI00013885	CASP14 Caspase-14	9
IPI00071318	LUC7L Isoform 1 of Putative RNA-binding protein Luc7-like 1	9
IPI00103481	KRT72 Isoform 1 of Keratin type II cytoskeletal 72	9
IPI00141318	CKAP4 Cytoskeleton-associated protein 4	9
IPI00182757	KIAA1967 Isoform 1 of Protein KIAA1967	9
IPI00215719	RPL18 60S ribosomal protein L18	9
IPI00216237	RPL36 60S ribosomal protein L36	9
IPI00219330	ILF3 Isoform 5 of Interleukin enhancer-binding factor 3	9
IPI00219616	PRPS1 Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	9
IPI00221089	RPS13 40S ribosomal protein S13	9
IPI00332936	ZC3HAV1 Isoform 2 of Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	9
IPI00333010	CHERP Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	9

IPI00396378	HNRNPA2B1 Isoform B1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	9
IPI00414197	WDR26 Isoform 1 of WD repeat-containing protein 26	9
IPI00414676	HSP90AB1 Heat shock protein HSP 90-beta	9
IPI00426051	IGHG2 Putative uncharacterized protein DKFZp686C15213	9
IPI00554648	KRT8 Keratin type II cytoskeletal 8	9
IPI00556297	SRSF6 Arginine/serine-rich splicing factor 6 variant (Fragment)	9
IPI00646961	HDX Isoform 1 of Highly divergent homeobox	9
IPI00000874	PRDX1 Peroxiredoxin-1	8
IPI00005511	PHF5A PHD finger-like domain-containing protein 5A	8
IPI00005537	SLC25A10 cDNA FLJ60124 highly similar to Mitochondrial dicarboxylate carrier	8
IPI00006725	DDX23 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	8
IPI00010404	SF3B5 Splicing factor 3B subunit 5	8
IPI00012345	SRSF6 Isoform SRP55-1 of Serine/arginine-rich splicing factor 6	8
IPI00013452	EPRS Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	8
IPI00017963	SNRPD2 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	8
IPI00030274	NSRP1 Nuclear speckle splicing regulatory protein 1	8
IPI00039864	RANBP10 Ran-binding protein 10	8
IPI00061200	KRT71 Keratin type II cytoskeletal 71	8
IPI00106955	C11orf84 Uncharacterized protein C11orf84	8
IPI00179964	PTBP1 Isoform 1 of Polypyrimidine tract-binding protein 1	8
IPI00219155	RPL27 60S ribosomal protein L27	8
IPI00297779	CCT2 T-complex protein 1 subunit beta	8
IPI00304692	RBMX Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	8
IPI00307155	ROCK2 Rho-associated protein kinase 2	8
IPI00395998	RPL32 60S ribosomal protein L32	8
IPI00396321	LRRCS9 Leucine-rich repeat-containing protein 59	8
IPI00414604	E2F7 Isoform 1 of Transcription factor E2F7	8
IPI00479058	RPS15 40S ribosomal protein S15	8
IPI00514908	KPRP Keratinocyte proline-rich protein	8
IPI00783271	LRPPRC Leucine-rich PPR motif-containing protein mitochondrial	8
IPI00783559	EXOC2 Exocyst complex component 2	8
IPI00784202	YBX1P2 Similar to YB-1 protein	8
IPI00848328	- Similar to Peroxisomal enoyl-coenzyme A hydratase-like protein	8
IPI00880007	MAP4 Microtubule-associated protein	8
IPI00909735	AP2B1 cDNA FLJ54516 highly similar to Adapter-related protein complex 2 beta-1 subunit	8
IPI00927454	ACAP2 Protein	8
IPI00981193	RPS3 Uncharacterized protein	8
IPI00983034	PABPC1 Protein	8
IPI00004511	PFKFB3 Isoform 1 of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	7
IPI00005969	CAPZA1 F-actin-capping protein subunit alpha-1	7
IPI00007188	SLC25A5 ADP/ATP translocase 2	7
IPI00009342	IQGAP1 Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	7
IPI00009650	LCN1 Lipocalin-1	7
IPI00013917	RPS12 40S ribosomal protein S12	7
IPI00018534	HIST1H2BL Histone H2B type 1-L	7
IPI00020487	LACRT Extracellular glycoprotein lacritin	7
IPI00020729	IRS4 Insulin receptor substrate 4	7
IPI00022228	HDLBP Vigilin	7
IPI00023038	PRB1 Basic salivary proline-rich protein 1	7
IPI00027285	SNRPB Isoform SM-B~ of Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B~	7
IPI00027547	DCD Dermcidin	7
IPI00027626	CCT6A T-complex protein 1 subunit zeta	7
IPI00029750	RPS24 Isoform 1 of 40S ribosomal protein S24	7
IPI00029764	SF3A3 Splicing factor 3A subunit 3	7
IPI00033516	TUBGCP3 Isoform 1 of Gamma-tubulin complex component 3	7
IPI00059279	EXOC4 Exocyst complex component 4	7
IPI00159652	FRYL Isoform 2 of Protein furry homolog-like	7
IPI00168728	IGHM FLJ00385 protein (Fragment)	7
IPI00179330	RPS27A Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	7
IPI00216592	HNRNPC Isoform C1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	7

IPI00219160	RPL34 60S ribosomal protein L34	7
IPI00290439	SRPK1 cDNA FUJ58405 highly similar to Serine/threonine-protein kinase SRPK1	7
IPI00297477	SNRPA1 U2 small nuclear ribonucleoprotein A~	7
IPI00373877	ZNF326 Isoform 1 of Zinc finger protein 326	7
IPI00376798	RPL11 Isoform 1 of 60S ribosomal protein L11	7
IPI00411453	AP3D1 Isoform 1 of AP-3 complex subunit delta-1	7
IPI00411733	DHX30 Isoform 1 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	7
IPI00426060	IGHA1 Putative uncharacterized protein DKFZp686J11235 (Fragment)	7
IPI00465248	ENO1 Isoform alpha-enolase of Alpha-enolase	7
IPI00465275	RANBP9 Isoform 1 of Ran-binding protein 9	7
IPI00478327	- Ribosomal protein S4 family protein	7
IPI00549736	ASCC2 Isoform 1 of Activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	7
IPI00741317	CSNK2A1 Uncharacterized protein	7
IPI00782985	EIF4G2 Isoform 2 of Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2	7
IPI00939523	DDX46 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46 isoform CRA_a	7
IPI00947285	SBSN suprabasin isoform 1 precursor	7
IPI00002135	TACC3 Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	6
IPI00003168	PRPSAP2 Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 2	6
IPI00005904	DDX20 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20	6
IPI00007765	HSPA9 Stress-70 protein mitochondrial	6
IPI00008527	RPLP1 60S acidic ribosomal protein P1	6
IPI00008575	KHDRBS1 Isoform 1 of KH domain-containing RNA-binding signal transduction-associated protein 1	6
IPI00010720	CCT5 T-complex protein 1 subunit epsilon	6
IPI00011937	PRDX4 Peroxiredoxin-4	6
IPI00012535	DNAJA1 DnaJ homolog subfamily A member 1	6
IPI00012750	RPS25 40S ribosomal protein S25	6
IPI00013070	HNRNPUL1 Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	6
IPI00017339	SF3B4 Splicing factor 3B subunit 4	6
IPI00017964	SNRPD3 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	6
IPI00022229	APOB Apolipoprotein B-100	6
IPI00022429	ORM1 Alpha-1-acid glycoprotein 1	6
IPI00025491	EIF4A1 Eukaryotic initiation factor 4A-I	6
IPI00026271	RPS14 40S ribosomal protein S14	6
IPI00027717	GEMIN4 Component of gems 4	6
IPI00029631	ERH Enhancer of rudimentary homolog	6
IPI00029705	TUBGCP2 Gamma-tubulin complex component 2	6
IPI00029731	RPL35A 60S ribosomal protein L35a	6
IPI00074148	DST Uncharacterized protein	6
IPI00107745	LUC7L3 Isoform 1 of Luc7-like protein 3	6
IPI00216099	DSC1 Isoform 1A of Desmocollin-1	6
IPI00218414	CA2 Carbonic anhydrase 2	6
IPI00221091	RPS15A 40S ribosomal protein S15a	6
IPI00250153	YBX2 Y-box-binding protein 2	6
IPI00294891	NOP2 Isoform 1 of Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2	6
IPI00298696	TCOF1 Isoform 2 of Treacle protein	6
IPI00300052	KRT84 Keratin type II cuticular Hb4	6
IPI00328103	KRT27 Keratin type I cytoskeletal 27	6
IPI00328715	MTDH Protein LYRIC	6
IPI00376144	LRCH1 Isoform 2 of Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 1	6
IPI00399007	IGHG2 Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment)	6
IPI00412607	RPL35 60S ribosomal protein L35	6
IPI00419373	HNRNP A3 Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	6
IPI00438229	TRIM28 Isoform 1 of Transcription intermediary factor 1-beta	6
IPI00552432	PRB2 Basic salivary proline-rich protein 2	6
IPI00646917	NUDT21 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	6
IPI00655650	RPS26 40S ribosomal protein S26	6
IPI00740019	CCDC88C Isoform 1 of Protein Daple	6
IPI00759723	RARS Isoform Monomeric of Arginyl-tRNA synthetase cytoplasmic	6
IPI00871174	MYCBP C-Myc-binding protein	6
IPI00930678	SNRPD2 small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 isoform 2	6

IPI00976928	- Similar to Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region	6
IPI00000015	SRSF4 Serine/arginine-rich splicing factor 4	5
IPI00004573	PIGR Polymeric immunoglobulin receptor	5
IPI00004671	GOLGB1 Golgin subfamily B member 1	5
IPI00005613	U2AF1 Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	5
IPI00007047	S100A8 Protein S100-A8	5
IPI00007927	SMC2 Isoform 1 of Structural maintenance of chromosomes protein 2	5
IPI00008438	RPS10 40S ribosomal protein S10	5
IPI00009104	RUVBL2 RuvB-like 2	5
IPI00009328	EIF4A3 Eukaryotic initiation factor 4A-III	5
IPI00012074	HNRNPR Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	5
IPI00018140	SYNCRIP Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	5
IPI00018465	CCT7 T-complex protein 1 subunit eta	5
IPI00020416	TPP2 Tripeptidyl-peptidase 2	5
IPI00020771	MAP7 Isoform 3 of Enscosin	5
IPI00021187	RUVBL1 Isoform 1 of RuvB-like 1	5
IPI00021435	PSMC2 26S protease regulatory subunit 7	5
IPI00022974	PIP Prolactin-inducible protein	5
IPI00026126	SCGB2A1 Mammaglobin-B	5
IPI00026230	HNRNPH2 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	5
IPI00026256	FLG Filaggrin	5
IPI00026302	RPL31 60S ribosomal protein L31	5
IPI00027462	S100A9 Protein S100-A9	5
IPI00027831	GRWD1 Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1	5
IPI00028570	GSK3B Isoform 1 of Glycogen synthase kinase-3 beta	5
IPI00029266	SNRPE Small nuclear ribonucleoprotein E	5
IPI00030320	DDX6 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	5
IPI00031556	U2AF2 Isoform 1 of Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	5
IPI00032184	FAM149B1 Isoform 1 of Protein FAM149B1	5
IPI00032325	CSTA Cystatin-A	5
IPI00032374	RRP1B Isoform 2 of Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	5
IPI00032541	KRT85 Keratin type II cuticular Hb5	5
IPI00033561	RNPS1 Isoform 1 of RNA-binding protein with serine-rich domain 1	5
IPI00161600	C1orf79 Cooperator of PRMT5	5
IPI00166729	AZGP1 Zinc-alpha-2-glycoprotein	5
IPI00215743	RRBP1 Isoform 3 of Ribosome-binding protein 1	5
IPI00216298	TXN Thioredoxin	5
IPI00217013	SMEK1 Isoform 1 of Serine/threonine-protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	5
IPI00217465	HIST1H1C Histone H1.2	5
IPI00220871	RPL37 60S ribosomal protein L37	5
IPI00221325	RANBP2 E3 SUMO-protein ligase RanBP2	5
IPI00290078	KRT4 cDNA FLJ58275 highly similar to Keratin type II cytoskeletal 4	5
IPI00290566	TCP1 T-complex protein 1 subunit alpha	5
IPI00299608	PSMD1 Isoform 1 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	5
IPI00300990	CHTOP Isoform 1 of Chromatin target of PRMT1 protein	5
IPI00302850	SNRPD1 Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	5
IPI00302927	CCT4 T-complex protein 1 subunit delta	5
IPI00304187	RBM28 RNA-binding protein 28	5
IPI00306959	KRT7 Keratin type II cytoskeletal 7	5
IPI00328298	SMC4 Isoform 2 of Structural maintenance of chromosomes protein 4	5
IPI00328319	RBBP4 Isoform 1 of Histone-binding protein RBBP4	5
IPI00335168	MYL6 Isoform Non-muscle of Myosin light polypeptide 6	5
IPI00337602	ZNF326 cDNA FLJ50345 highly similar to Zinc finger protein 326	5
IPI00375911	KRT25 Keratin type I cytoskeletal 25	5
IPI00399254	OTUD4 Isoform 1 of OTU domain-containing protein 4	5
IPI00465363	HIST1H2BA Histone H2B type 1-A	5
IPI00556259	PABPC1L Polyadenylate-binding protein 1-like	5
IPI00643000	PRPS1 Uncharacterized protein	5
IPI00658000	IGF2BP3 Isoform 1 of Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	5
IPI00719622	RPS28 40S ribosomal protein S28	5

IPI00783313	PYGL Glycogen phosphorylase liver form	5
IPI00878236	FSIP2 fibrous sheath-interacting protein 2	5
IPI00915820	- Anti-folate binding protein (Fragment)	5
IPI00916572	RPL31 Protein	5
IPI00940245	IGHA2 Immunoglobulin heavy chain variant (Fragment)	5
IPI00940685	SNRNP40 U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein	5
IPI00966213	LUC7L3 cDNA FLJ59548 highly similar to Cisplatin resistance-associated overexpressed protein	5
IPI00973279	PCNT Isoform 2 of Pericentrin	5
IPI01009785	EPRS Uncharacterized protein	5
IPI01012111	- Similar to 60S ribosomal protein L29	5
IPI01019129	HDLBP cDNA FLJ55700 moderately similar to Vigilin	5
IPI00002624	PLRG1 Isoform 1 of Pleiotropic regulator 1	4
IPI00003515	TRIP11 Thyroid receptor-interacting protein 11	4
IPI00003566	HOMER1 Isoform 1 of Homer protein homolog 1	4
IPI00003881	HNRNPF Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	4
IPI00004273	RBM25 Isoform 1 of RNA-binding protein 25	4
IPI00005705	PPP1CC Isoform Gamma-1 of Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	4
IPI00006103	CD2BP2 CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2	4
IPI00007401	IPO8 Importin-8	4
IPI00010368	KIF2A Uncharacterized protein	4
IPI00012500	BRIP1 Isoform 1 of Fanconi anemia group J protein	4
IPI00013774	HDAC1 Histone deacetylase 1	4
IPI00014456	STRN Isoform 1 of Striatin	4
IPI00015838	LYAR Cell growth-regulating nucleolar protein	4
IPI00015905	EXOSC2 Exosome complex component RRP4	4
IPI00016572	SNRPG Small nuclear ribonucleoprotein G	4
IPI00018146	YWHAQ 14-3-3 protein theta	4
IPI00018233	SPDEF SAM pointed domain-containing Ets transcription factor	4
IPI00018278	H2AFV Histone H2A.V	4
IPI00021129	AP3B1 Isoform 1 of AP-3 complex subunit beta-1	4
IPI00021263	YWHAZ 14-3-3 protein zeta/delta	4
IPI00021290	ACLY ATP-citrate synthase	4
IPI00021924	H1FX Histone H1x	4
IPI00022790	MFAP1 Microfibrillar-associated protein 1	4
IPI00023461	MLLT4 Isoform 4 of Afadin	4
IPI00030275	TRAP1 Heat shock protein 75 kDa mitochondrial	4
IPI00031523	HSP90AA2 Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2	4
IPI00031554	DDX50 ATP-dependent RNA helicase DDX50	4
IPI00043201	CENPJ Centromere protein J	4
IPI00061178	RBMXL1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G-like 1	4
IPI00100151	XRN2 Isoform 1 of 5'-3' exoribonuclease 2	4
IPI00102069	EIF3M Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	4
IPI00152510	DDX54 Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase DDX54	4
IPI00180956	- Uncharacterized protein	4
IPI00182655	KRT86 Keratin type II cuticular Hb6	4
IPI00217437	TTBK2 Uncharacterized protein	4
IPI00217466	HIST1H1D Histone H1.3	4
IPI00218236	PPP1CB Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	4
IPI00218474	ENO3 Isoform 1 of Beta-enolase	4
IPI00219352	CBS Isoform 1 of Cystathionine beta-synthase	4
IPI00220624	AKAP9 A-kinase anchor protein 9 isoform 2	4
IPI00220642	YWHAQ 14-3-3 protein gamma	4
IPI00237011	STK38L Serine/threonine-protein kinase 38-like	4
IPI00289601	HDAC2 Histone deacetylase 2	4
IPI00292496	TUBB8 Tubulin beta-8 chain	4
IPI00293464	DDB1 DNA damage-binding protein 1	4
IPI00296161	IL1RL1 Isoform A of Interleukin-1 receptor-like 1	4
IPI00305477	CST1 Cystatin-SN	4
IPI00328293	SRRM1 cDNA FLJ61739 highly similar to Serine/arginine repetitive matrix protein 1	4
IPI00329583	SPATA5 Isoform 1 of Spermatogenesis-associated protein 5	4

IPI00385001	NUP188 Isoform 2 of Nucleoporin NUP188 homolog	4
IPI00386758	NEFH Isoform 2 of Neurofilament heavy polypeptide	4
IPI00478966	PFKFB3 Uncharacterized protein	4
IPI00549813	PRMT8 Isoform 1 of Protein arginine N-methyltransferase 8	4
IPI00550247	RPL35 Protein	4
IPI00719047	- Putative uncharacterized protein	4
IPI00735540	LOC440563 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like	4
IPI00738655	POTEJ POTE ankyrin domain family member J	4
IPI00798155	RPS27A Pseudogene candidate	4
IPI00844323	PRRC2B Isoform 5 of Protein PRRC2B	4
IPI00847956	- Similar to 40S ribosomal protein S27	4
IPI00909466	HNRNPL cDNA FLJ55127 highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	4
IPI00921414	- Chaperonin Cpn60/TCP-1 family protein	4
IPI00922194	CDK16 cDNA FLJ56198 highly similar to Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-1	4
IPI00925437	PSMD2 Protein	4
IPI00953461	LARP4B La-related protein 4B	4
IPI00979880	KIAA1967 Protein	4
IPI01021686	MARS 24 kDa protein	4
IPI01022801	HNRNPA1 Uncharacterized protein	4
IPI00001712	CTNNA3 Isoform 1 of Catenin alpha-3	3
IPI00001757	RBM8A Isoform 1 of RNA-binding protein 8A	3
IPI00002236	MFG8 cDNA FLJ59612 highly similar to Lactadherin	3
IPI00002335	HTT huntingtin	3
IPI00002689	TRPC4 Isoform Alpha of Short transient receptor potential channel 4	3
IPI00003269	ACTBL2 Beta-actin-like protein 2	3
IPI00003377	SRSF7 Isoform 1 of Serine/arginine-rich splicing factor 7	3
IPI00008085	SLC39A10 Zinc transporter ZIP10	3
IPI00010740	SFPQ Isoform Long of Splicing factor proline- and glutamine-rich	3
IPI00010903	DOPEY1 Uncharacterized protein	3
IPI00011893	- mRNA clone with similarity to L-glycerol-3-phosphate:NAD oxidoreductase and albumin gene sequences	3
IPI00013890	SFN Isoform 1 of 14-3-3 protein sigma	3
IPI00015309	KRT12 Keratin type I cytoskeletal 12	3
IPI00017341	SF3A2 SF3A2 protein (Fragment)	3
IPI00017448	RPS21 40S ribosomal protein S21	3
IPI00018350	MCM5 DNA replication licensing factor MCM5	3
IPI00018510	SPIN2A Spindlin-2A	3
IPI00020692	SCN3A Isoform 1 of Sodium channel protein type 3 subunit alpha	3
IPI00021298	KRT20 Keratin type I cytoskeletal 20	3
IPI00021728	EIF2S2 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	3
IPI00022744	CSE1L Isoform 1 of Exportin-2	3
IPI00023591	PURA Transcriptional activator protein Pur-alpha	3
IPI00027107	TUFM elongation factor Tu mitochondrial precursor	3
IPI00031423	KRT33B Keratin type I cuticular Ha3-II	3
IPI00031508	DHX8 ATP-dependent RNA helicase DHX8	3
IPI00043863	MAP4 Uncharacterized protein	3
IPI00060800	ZG16B Zymogen granule protein 16 homolog B	3
IPI00069084	TRRAP Isoform 1 of Transformation/transcription domain-associated protein	3
IPI00103483	COBRA1 Negative elongation factor B	3
IPI00164949	TH1L TH1-like (Drosophila) isoform CRA_b	3
IPI00165947	FGFR1 basic fibroblast growth factor receptor 1 isoform 11 precursor	3
IPI00165981	ZNF1 Isoform 1 of NFX1-type zinc finger-containing protein 1	3
IPI00168184	PPP2R1A cDNA FLJ56053 highly similar to Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	3
IPI00169325	WDR36 WD repeat-containing protein 36	3
IPI00174345	SPAG17 Sperm-associated antigen 17	3
IPI00178352	FLNC Isoform 1 of Filamin-C	3
IPI00181617	RBM34 Isoform 1 of RNA-binding protein 34	3
IPI00182289	RPS29 40S ribosomal protein S29	3
IPI00217507	NEFM Neurofilament medium polypeptide	3
IPI00217540	KDM1A Isoform 2 of Lysine-specific histone demethylase 1A	3
IPI00217960	PRKACA Isoform 2 of cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	3

IPI00218207	SPTBN2 Isoform 2 of Spectrin beta chain brain 2	3
IPI00218371	PRPS1L1 Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3	3
IPI00218733	SOD1 Superoxide dismutase [Cu-Zn]	3
IPI00219156	RPL30 60S ribosomal protein L30	3
IPI00220344	RPL36A 60S ribosomal protein L36a isoform a	3
IPI00294955	LSM4 U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM4	3
IPI00297982	EIF2S3 Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	3
IPI00305833	SMU1 WD40 repeat-containing protein SMU1	3
IPI00328268	EIF4G3 eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 isoform 1	3
IPI00334914	TRMT1L Isoform 1 of TRMT1-like protein	3
IPI00383815	GFAP Isoform 2 of Glial fibrillary acidic protein	3
IPI00395865	RBBP7 Histone-binding protein RBBP7	3
IPI00414860	RPL37A 60S ribosomal protein L37a	3
IPI00419504	TAB2 Isoform 1 of TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2	3
IPI00419585	PPIA Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	3
IPI00419963	MAEA Isoform 4 of Macrophage erythroblast attacher	3
IPI00430472	ASCC3 Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	3
IPI00455626	RPTN Repetin	3
IPI00465084	DES Desmin	3
IPI00472614	ERC2 ERC protein 2	3
IPI00514399	RPS27 Uncharacterized protein	3
IPI00549725	PGAM1 Phosphoglycerate mutase 1	3
IPI00556594	ZCCHC8 Isoform 1 of Zinc finger CCHC domain-containing protein 8	3
IPI00641788	SNRPC U1 small nuclear ribonucleoprotein C	3
IPI00646555	SCAND3 SCAN domain-containing protein 3	3
IPI00658130	IGLV2-11 IGL@ protein	3
IPI00739565	UNC13C Protein unc-13 homolog C	3
IPI00743194	- Kappa light chain variable region (Fragment)	3
IPI00746221	FAM195B Protein FAM195B	3
IPI00789041	PNN Isoform 1 of Pinin	3
IPI00879639	MFGE8 HP47 protein (Fragment)	3
IPI00888712	POTEKP Putative beta-actin-like protein 3	3
IPI00893362	RYR3 Uncharacterized protein	3
IPI00909288	- cDNA FLJ51586 moderately similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	3
IPI00909544	DDX3X cDNA FLJ52848 highly similar to ATP-dependent RNA helicase DDX3X	3
IPI00910759	- cDNA FLJ79368 highly similar to Spliceosome RNA helicase Bat1	3
IPI00967876	RPL9 Protein	3
IPI00981659	- Similar to Cold agglutinin FS-1 H-chain	3
IPI00983638	MTDH Protein	3
IPI00985001	PABPC4 Protein	3
IPI01022498	NAP1L1 Uncharacterized protein	3
IPI00292326	SPAG1 Sperm-associated antigen 1	2
IPI00300053	KRT82 Keratin type II cuticular Hb2	2
IPI00301503	TRA2B Isoform 1 of Transformer-2 protein homolog beta	2
IPI00375843	KRT80 Isoform 3 of Keratin type II cytoskeletal 80	2
IPI00829827	- 13 kDa protein	2
IPI00829947	IGKV1-5 Similar to Ig kappa chain V-II region GM607 precursor	2

Summary of gene silencing screening data. Results of the shRNA screen targeting 27 CTNNB1 modulated interactors (five independent shRNA per gene). Results are presented as percentage inhibition for the two separate experiments and their average in the WNT3A, BIO and EF1 α screens.

TRC Id	NM ID	Gene ID	WNT3A n=1	WNT3A n=2	WNT3A average	BIO n=1	BIO n=2	BIO average	pEF1a n=1	pEF1a n=2	pEF1a average
TRCN000065058	NM_003664	AP3B1	25%	36%	31%	37%	89%	63%	15%	9%	12%
TRCN000065059	NM_003664	AP3B1	-179%	-190%	-184%	-292%	11%	-140%	17%	-17%	0%
TRCN000065060	NM_003664	AP3B1	64%	18%	41%	50%	-20%	15%	-8%	5%	-2%
TRCN000065061	NM_003664	AP3B1	56%	46%	51%	30%	39%	35%	-12%	-11%	-11%
TRCN000065062	NM_003664	AP3B1	55%	44%	50%	69%	86%	77%	14%	-3%	5%
TRCN000150338	NM_020824	ARHGAP21	-36%	2%	-17%	-219%	-82%	-200%	-1%	-1%	-1%
TRCN000154948	NM_020824	ARHGAP21	-19%	-66%	-43%	-9%	-67%	-55%	-36%	-12%	-24%
TRCN000154949	NM_020824	ARHGAP21	-27%	-27%	-27%	-50%	78%	-9%	-18%	20%	1%
TRCN000156175	NM_020824	ARHGAP21	0%	16%	8%	-58%	13%	-47%	27%	5%	16%
TRCN000150898	NM_020824	ARHGAP21	-92%	-187%	-140%	-28%	-34%	-51%	-34%	17%	-8%
TRCN000157145	NM_005998	CCT3	-1%	38%	18%	42%	69%	47%	-4%	3%	0%
TRCN000155458	NM_005998	CCT3	-112%	-59%	-85%	-294%	-68%	-242%	3%	19%	11%
TRCN000154461	NM_005998	CCT3	15%	42%	28%	-8%	7%	-18%	-32%	-5%	-18%
TRCN000156792	NM_005998	CCT3	-23%	25%	1%	-400%	-77%	-315%	-13%	2%	-6%
TRCN000154796	NM_005998	CCT3	85%	91%	88%	85%	91%	85%	-24%	23%	0%
TRCN000148903	NM_004389	CTNNA2	-3%	18%	7%	-132%	-31%	-118%	-11%	5%	-3%
TRCN000149367	NM_004389	CTNNA2	-251%	-43%	-147%	-245%	-54%	-202%	-23%	-10%	-16%
TRCN000150270	NM_004389	CTNNA2	9%	-1%	4%	-109%	21%	-76%	-15%	-7%	-11%
TRCN000147074	NM_004389	CTNNA2	-164%	-15%	-89%	19%	52%	23%	-9%	2%	-4%
TRCN000147992	NM_004389	CTNNA2	-13%	24%	6%	-218%	1%	-157%	-37%	-7%	-22%
TRCN000021829	NM_020248	CTNNBIP1	66%	84%	75%	54%	68%	61%	-1%	-8%	-4%
TRCN000021830	NM_020248	CTNNBIP1	-3%	32%	15%	40%	38%	39%	24%	6%	15%
TRCN000021831	NM_020248	CTNNBIP1	-561%	-470%	-515%	-33%	-36%	-34%	-14%	8%	-3%
TRCN000021832	NM_020248	CTNNBIP1	-12%	-44%	-28%	-10%	67%	28%	-44%	-8%	-26%
TRCN000082853	NM_001923	DDB1	-209%	-132%	-171%	29%	-47%	-41%	-19%	28%	5%
TRCN000082854	NM_001923	DDB1	-21%	16%	-3%	-107%	-7%	-149%	-23%	-14%	-19%
TRCN000082855	NM_001923	DDB1	20%	-9%	5%	45%	43%	19%	15%	39%	27%
TRCN000082856	NM_001923	DDB1	-43%	3%	-20%	-66%	-9%	-111%	5%	35%	20%
TRCN000082857	NM_001923	DDB1	-520%	-234%	-377%	-70%	-69%	-145%	-26%	17%	-4%
TRCN000010513	NM_004941	DHX8	-116%	-1%	-59%	-152%	-118%	-173%	0%	10%	5%
TRCN000000025	NM_004941	DHX8	-305%	-74%	-190%	-31%	-16%	-44%	20%	36%	28%
TRCN000000026	NM_004941	DHX8	42%	64%	53%	38%	37%	28%	-22%	23%	0%
TRCN000000027	NM_004941	DHX8	-99%	-11%	-55%	30%	-21%	-6%	-42%	15%	-13%
TRCN000000028	NM_004941	DHX8	-4%	27%	11%	-32%	-22%	-48%	-5%	21%	8%
TRCN000053843	NM_001943	DSG2	17%	34%	25%	-12%	34%	11%	-11%	20%	5%
TRCN000053844	NM_001943	DSG2	-340%	-273%	-307%	2%	42%	22%	20%	7%	14%
TRCN000053845	NM_001943	DSG2	-3%	38%	17%	-31%	78%	23%	-9%	4%	-3%
TRCN000053846	NM_001943	DSG2	54%	78%	66%	50%	72%	61%	-7%	-9%	-8%
TRCN000053847	NM_001943	DSG2	-21%	27%	3%	11%	51%	31%	-21%	-26%	-23%
TRCN000083678	XM_048104	FLG	48%	75%	61%	-27%	14%	-63%	14%	1%	8%
TRCN000083679	XM_048104	FLG	-83%	20%	-31%	49%	61%	33%	14%	15%	15%
TRCN000083680	XM_048104	FLG	-489%	-142%	-316%	-81%	-45%	-144%	-13%	-11%	-12%
TRCN000083681	XM_048104	FLG	-947%	-202%	-575%	-221%	-77%	-292%	18%	11%	15%
TRCN000083682	XM_048104	FLG	-5%	20%	7%	53%	96%	54%	-19%	-4%	-12%
TRCN000004819	NM_001527	HDAC2	-99%	-69%	-84%	42%	-14%	5%	0%	16%	8%
TRCN000004823	NM_001527	HDAC2	93%	20%	57%	-14%	-62%	-55%	-39%	7%	-16%
TRCN000197086	NM_001527	HDAC2	-216%	-177%	-196%	-332%	-240%	-353%	14%	32%	23%
TRCN000196590	NM_001527	HDAC2	-35%	26%	-5%	-233%	-96%	-216%	-4%	0%	-2%
TRCN000195198	NM_001527	HDAC2	12%	22%	17%	-128%	-119%	-159%	-28%	1%	-13%
TRCN000154305	NM_005336	HDLBP	-63%	-59%	-61%	-26%	40%	-12%	-32%	-11%	-21%
TRCN000151220	NM_005336	HDLBP	-130%	-67%	-98%	-108%	-17%	-94%	-24%	-8%	-16%
TRCN000153823	NM_005336	HDLBP	-180%	-81%	-130%	-134%	15%	-96%	-4%	6%	1%
TRCN000150941	NM_005336	HDLBP	-36%	84%	24%	65%	82%	68%	-13%	9%	-2%
TRCN000153797	NM_005336	HDLBP	-259%	-159%	-209%	-193%	-48%	-166%	3%	8%	6%
TRCN000075113	NM_006107	LUC7L3	-59%	13%	-23%	-37%	-6%	-82%	-18%	5%	-6%
TRCN000075114	NM_006107	LUC7L3	-17%	-8%	-12%	-456%	-160%	-555%	-10%	1%	-5%
TRCN000075115	NM_006107	LUC7L3	-71%	10%	-30%	-136%	-70%	-208%	-9%	1%	-4%
TRCN000075116	NM_006107	LUC7L3	-301%	-196%	-248%	-8%	-38%	-71%	26%	6%	16%
TRCN000075117	NM_006107	LUC7L3	67%	77%	72%	71%	63%	54%	34%	22%	28%
TRCN000045658	NM_004990	MARS	-165%	-91%	-128%	-246%	92%	-130%	-12%	2%	-5%
TRCN000045659	NM_004990	MARS	-38%	99%	31%	-127%	3%	-62%	-21%	-14%	-17%
TRCN000045660	NM_004990	MARS	-77%	91%	7%	-126%	-10%	-68%	-36%	-28%	-32%
TRCN000045661	NM_004990	MARS	-105%	-26%	-66%	-60%	16%	-22%	-20%	-23%	-22%
TRCN000045662	NM_004990	MARS	-254%	-109%	-182%	-52%	0%	-26%	-18%	-18%	-18%
TRCN000117378	NM_005936	MLLT4	-218%	-58%	-138%	45%	41%	18%	13%	19%	16%
TRCN000117379	NM_005936	MLLT4	12%	45%	29%	-72%	8%	-108%	-13%	-2%	-7%
TRCN000117380	NM_005936	MLLT4	-1%	34%	17%	-35%	-71%	-114%	-22%	-11%	-17%
TRCN000117381	NM_005936	MLLT4	-47%	39%	-4%	-72%	-13%	-120%	-16%	-6%	-11%

TRCN000021649	NM_012333	MYCBP		-77%	-48%	-63%		-196%	-36%	-116%		6%	-22%	-8%
TRCN000021650	NM_012333	MYCBP		61%	61%	61%		73%	68%	71%		-17%	-22%	-20%
TRCN000021651	NM_012333	MYCBP		5%	-13%	-4%		-43%	1%	-21%		-15%	-20%	-17%
TRCN000021652	NM_012333	MYCBP		-918%	-464%	-691%		-76%	-50%	-63%		-14%	2%	-6%
TRCN000021653	NM_012333	MYCBP		-308%	-113%	-210%		53%	75%	64%		39%	53%	46%
TRCN000049413	NM_139126	PPIL4		-81%	-5%	-43%		20%	50%	35%		-21%	-16%	-18%
TRCN000049414	NM_139126	PPIL4		-49%	-18%	-34%		48%	19%	34%		45%	31%	38%
TRCN000049415	NM_139126	PPIL4		-25%	44%	10%		-69%	24%	-22%		-29%	-5%	-17%
TRCN000049416	NM_139126	PPIL4		-45%	-58%	-51%		-31%	44%	6%		-11%	-6%	-8%
TRCN000049417	NM_139126	PPIL4		80%	99%	89%		-22%	73%	7%		-23%	10%	-7%
TRCN000010716	NM_014225	PPP2R1A		30%	42%	36%		46%	68%	49%		-25%	1%	-12%
TRCN000010717	NM_014225	PPP2R1A		-9%	18%	4%		-87%	-15%	-80%		-15%	-8%	-11%
TRCN000010718	NM_014225	PPP2R1A		-881%	-627%	-754%		-423%	-258%	-421%		4%	4%	4%
TRCN000002567	NM_014225	PPP2R1A		-349%	-61%	-205%		32%	42%	27%		3%	26%	14%
TRCN000014533	NM_005859	PURA		47%	21%	34%		-27%	32%	-17%		-20%	9%	-6%
TRCN000014534	NM_005859	PURA		41%	61%	51%		-72%	3%	-61%		-17%	10%	-4%
TRCN000014535	NM_005859	PURA		23%	37%	30%		-113%	-9%	-94%		-30%	3%	-14%
TRCN000014536	NM_005859	PURA		28%	26%	27%		-67%	-72%	-96%		-22%	6%	-8%
TRCN000014537	NM_005859	PURA		18%	57%	38%		-251%	52%	-153%		-12%	11%	0%
TRCN000045428	NM_002887	RARS		-724%	-396%	-560%		-376%	-125%	-250%		-18%	15%	-2%
TRCN000045429	NM_002887	RARS		-18%	46%	14%		-94%	-12%	-53%		-9%	-16%	-13%
TRCN000045430	NM_002887	RARS		-158%	-62%	-110%		-71%	6%	-33%		-3%	-8%	-6%
TRCN000045431	NM_002887	RARS		40%	70%	55%		80%	70%	75%		15%	3%	9%
TRCN000045432	NM_002887	RARS		-143%	-35%	-89%		-69%	29%	-20%		-2%	-14%	-8%
TRCN000013523	NM_014781	RB1CC1		71%	74%	73%		56%	35%	39%		-28%	14%	-7%
TRCN000013524	NM_014781	RB1CC1		57%	77%	67%		6%	66%	22%		-2%	26%	12%
TRCN000013525	NM_014781	RB1CC1		-1305%	-706%	-1005%		-712%	-183%	-572%		-52%	13%	-19%
TRCN000013526	NM_014781	RB1CC1		-8%	-18%	-13%		-7%	-65%	-53%		-34%	4%	-15%
TRCN000013527	NM_014781	RB1CC1		-61%	-22%	-41%		-22%	15%	-22%		-28%	-1%	-15%
TRCN000051563	NM_006666	RUVBL2		-15%	18%	1%		55%	30%	42%		12%	11%	12%
TRCN000051564	NM_006666	RUVBL2		83%	91%	87%		81%	89%	85%		19%	31%	25%
TRCN000051565	NM_006666	RUVBL2		-20%	22%	1%		-38%	11%	-13%		-30%	-15%	-23%
TRCN000051566	NM_006666	RUVBL2		11%	34%	23%		67%	38%	53%		15%	4%	10%
TRCN000051567	NM_006666	RUVBL2		-944%	-471%	-707%		-670%	-95%	-382%		-5%	-13%	-9%
TRCN000062538	NM_006444	SMC2		19%	56%	37%		-74%	-28%	-51%		-4%	-4%	-4%
TRCN000062539	NM_006444	SMC2		-104%	-81%	-92%		-3%	96%	46%		-8%	0%	-4%
TRCN000062540	NM_006444	SMC2		-65%	-12%	-39%		-162%	66%	-48%		-1%	14%	6%
TRCN000062541	NM_006444	SMC2		20%	-12%	4%		-126%	-85%	-106%		-14%	-15%	-14%
TRCN000062542	NM_006444	SMC2		14%	25%	20%		25%	56%	41%		-10%	0%	-5%

TRCN000018000	NM_005762	TRIM28		-7%	46%	20%		-57%	37%	-34%		-47%	12%	-18%
TRCN000018001	NM_005762	TRIM28		72%	90%	81%		85%	85%	83%		-22%	13%	-4%
TRCN000018002	NM_005762	TRIM28		69%	44%	57%		40%	58%	40%		-15%	16%	1%
TRCN000017998	NM_005762	TRIM28		58%	47%	53%		28%	58%	32%		-12%	54%	21%
TRCN000017999	NM_005762	TRIM28		-44%	-14%	-29%		40%	18%	19%		-31%	18%	-6%
TRCN000001160	NM_007279	U2AF2		-32%	14%	-9%		20%	3%	-1%		-21%	14%	-3%
TRCN000001161	NM_007279	U2AF2		1%	10%	5%		-7%	-23%	-31%		-37%	10%	-13%
TRCN000001162	NM_007279	U2AF2		-171%	-101%	-136%		-100%	-21%	-92%		-34%	15%	-10%
TRCN000001163	NM_007279	U2AF2		-284%	-93%	-189%		21%	38%	17%		-12%	44%	16%
TRCN000001164	NM_007279	U2AF2		51%	45%	48%		40%	1%	12%		18%	29%	23%
TRCN000004520	NM_020120	UGGT1		-28%	-3%	-16%		-189%	-81%	-179%		10%	-2%	4%
TRCN000004521	NM_020120	UGGT1		-25%	32%	4%		-160%	-54%	-147%		-24%	11%	-6%
TRCN000004522	NM_020120	UGGT1		-107%	-43%	-75%		-162%	-25%	-134%		-23%	2%	-11%
TRCN000004523	NM_020120	UGGT1		-92%	-44%	-68%		-34%	9%	-33%		12%	0%	6%
TRCN000004524	NM_020120	UGGT1		-100%	-11%	-56%		47%	-29%	1%		-26%	8%	-9%
TRCN000004516	NM_020119	ZC3HAV1 (ZAPS)		-109%	-39%	-74%		-5%	-47%	-42%		-58%	-6%	-32%
TRCN000004517	NM_020119	ZC3HAV1 (ZAPS)		54%	60%	57%		31%	44%	27%		9%	27%	18%
TRCN000004518	NM_020119	ZC3HAV1 (ZAPS)		34%	9%	22%		87%	65%	74%		-38%	15%	-12%
TRCN000004519	NM_020119	ZC3HAV1 (ZAPS)		-11%	15%	2%		-44%	46%	-22%		-44%	22%	-11%
TRCN000010886	NM_020119	ZC3HAV1 (ZAPS)		24%	31%	27%		1%	19%	-5%		-22%	-14%	-18%
TRCN000013423	NM_005455	ZRANB2		14%	25%	19%		-106%	-1%	-85%		-8%	4%	-2%
TRCN000013424	NM_005455	ZRANB2		-153%	-33%	-93%		-43%	54%	-16%		-15%	0%	-8%
TRCN000013425	NM_005455	ZRANB2		-77%	-16%	-47%		-98%	-38%	-99%		-28%	13%	-8%
TRCN000013426	NM_005455	ZRANB2		-24%	11%	-6%		-90%	-16%	-82%		1%	24%	12%
TRCN000013427	NM_005455	ZRANB2		46%	57%	51%		-50%	-47%	-71%		-54%	-6%	-30%